

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DESARROLLO DE UN EXTRACTO PREBIÓTICO A PARTIR  
DEL ALGA *Silvetia compressa***

Por:

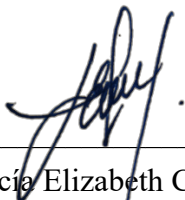
**BENJAMÍN VÁZQUEZ RODRÍGUEZ**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
con Orientación en Biotecnología

2021

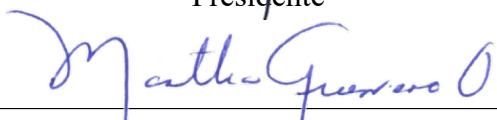
# DESARROLLO DE UN EXTRACTO PREBIÓTICO A PARTIR DEL ALGA *Silvetia compressa*

Comité de Tesis



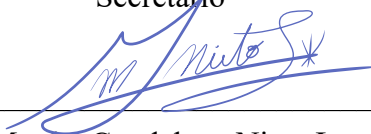
---

Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez  
Presidente



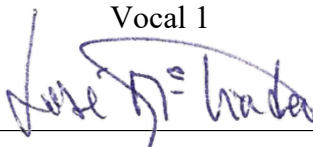
---

Dr. Martha Guerrero Olazarán  
Secretario



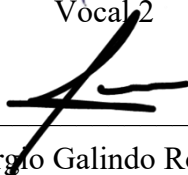
---

Dra. Martha Guadalupe Nieto López  
Vocal 1



---

Dr. José María Viader Salvadó  
Vocal 2



---

Dr. Sergio Galindo Rodríguez  
Vocal 3



---

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Subdirector de Posgrado

SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

# **DESARROLLO DE UN EXTRACTO PREBIÓTICO A PARTIR**

## **DEL ALGA *Silvetia compressa***

Dirección de tesis



---

Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez

Director



---

Dra. Janet Alejandra Gutiérrez Uribe

Director externo

## **AVISOS DERECHOS DE AUTOR**

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: Evaluación multidisciplinaria del potencial nutracéutico de macroalgas en camarones y murinos y su repercusión en el manejo de enfermedades bacterianas y metabólicas #2014-238458.

Beca de posgrado de CONACyT. No de registro: 608491

Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en los siguientes congresos y eventos:

Vázquez-Rodríguez B, Gutiérrez-Urbe JA, Antunes-Ricardo M, Santos-Zea L, Cruz-Suárez LE. 2018. Evaluación del efecto prebiótico de florotaninos y polisacáridos del alga parda *Pelvetia compressa*. 3er. Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutracéuticos CIAD. CONACyT. Mazatlán, Sinaloa. Junio 20-22 de 2018.

Vázquez-Rodríguez B, Heredia-Olea E, Acevedo-Pacheco L, Gutiérrez-Urbe J, Cruz-Suárez LE. 2019. *In vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation of a *S. compressa* hydroethanolic extract and its polysaccharide fraction, and their effect on human fecal microbiota. 23rd International Seaweed Symposium (ISS) 2019. Jeju, Korea. April 28-May 3

Vázquez-Rodríguez B. 2021. Efecto prebiótico de algas pardas en la composición de la microbiota intestinal humana. 2do Simposio Microbiota intestinal. Instituto Mexicano de Nutrición Alimentación y Obesidad. Modalidad virtual México. Agosto 19-20, 2021

Además, ha sido publicado en las revistas: *Journal of Applied Phycology* (FI 3.22) y *Journal of Functional Foods* (FI 4.35).

Vázquez-Rodríguez B, Gutiérrez-Urbe JA, Antunes-Ricardo M, Santos-Zea L y Cruz-Suárez LE. 2020. Ultrasound assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*. 32, 1441–1453 <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02013-2>

Vázquez-Rodríguez B, Santos-Zea L, Heredia-Olea E, Acevedo-Pacheco L, Santacruz A, Gutiérrez-Urbe JA, Cruz-Suárez LE. 2021. Effects of phlorotannin and polysaccharide fractions of brown seaweed *Silvetia compressa* on human gut microbiota composition using an *in vitro* colonic model. *Journal of Functional Foods*, 84, 104596, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104596>

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis doctoral, Dra. L. Elizabeth Cruz-Suarez, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a esta facultad. Así mismo, agradezco a mis compañeros del Centro de Biotecnología FEMSA del Tecnológico de Monterrey por el apoyo personal y humano, especialmente a las coordinadoras del centro de investigación, a la Msc. Berenice Enríquez y a la Msc Aydee Coronado, que me ayudaron en todas las necesidades que este proyecto de investigación fue generando a lo largo de los años. Al Dr. Erick Heredia-Olea, el Dr. Daniel Guajardo-Flores a la Dra. Marilena Antunes-Ricardo, a la Dra. Liliana Santos-Zea y a la Dra. Beatriz Acosta-Estrada, con quienes he compartido proyectos durante estos años y que, sin su ayuda en todos los experimentos realizados durante mi tesis, no habría podido terminar este proyecto de vida.

Un trabajo de investigación es siempre conlleva trabajo en conjunto, en quipo con proyectos y labores previas de otros integrantes. En este caso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Janet Gutiérrez-Urbe, del Tecnológico de Monterrey, con quien por su confianza y apoyo estaré siempre en deuda. Gracias por su amabilidad para facilitarme el espacio de trabajo, su tiempo y sus ideas. Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, mi agradecimiento a la Dra. Arlette Santacruz, y a la Dra. Laura Acevedo-Pacheco. Este trabajo de investigación es también fruto del apoyo nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos ánimos, ni fuerza motriz que nos aliente a crecer como individuos y profesionales. Gracias a mis padres y a mi hermano, porque me alentaron y ayudaron cuando más desesperado estaba; esta tesis es también de ellos. Gracias a mis amigos, que siempre fueron un gran apoyo moral, necesarios en los casi constantes momentos de incertidumbre. Pero, sobre todo, gracias a mi amor Gabriella, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me ha permitido robar de nuestra historia como pareja. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría realizado y escrito, por eso, este trabajo es también el suyo. A todos, muchas gracias

## **DEDICATORIAS**

Dedico este trabajo a mis padres, Marina y Benjamín quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy este proyecto, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y perseverancia, de no temer las adversidades. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos y compañeros, del grupo de enfoque NutriOmics y de la Escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey por apoyarme cuando más lo necesitaba, por extender su mano en momentos muy difíciles, por la convivencia y el consejo brindado cada día, de verdad mil gracias, siempre los llevo en mi corazón.



## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	7
DEDICATORIAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	12
ÍNDICE DE FIGURAS .....	13
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS. ....	15
1. RESUMEN .....	17
2. ABSTRACT .....	19
3. INTRODUCCIÓN .....	21
3.1 <i>Silvetia compressa</i> y las algas pardas. ....	21
4. ANTECEDENTES .....	23
4.1 Polisacáridos y florotaninos moléculas bioactivas presentes en algas pardas.....	23
4.2 Tecnologías y técnicas para la extracción de polisacáridos y florotaninos.....	25
4.3 Efecto prebiótico .....	27
4.4 Extracción asistida con ultrasonido .....	29
4.5 Secado por aspersión y microencapsulación .....	31
5. JUSTIFICACIÓN .....	33
6. HIPÓTESIS .....	35
7. OBJETIVO DEL TRABAJO .....	36
8. OBJETIVOS PARTICULARES .....	36
9. CAPITULO 1: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDO DE FLOROTANINOS Y POLISACÁRIDOS DEL ALGA <i>S. compressa</i> . 37	
9.1 Resumen.....	37
9.2 Introducción .....	38
9.3 Materiales y Métodos.....	41
9.3.1 Alga y reactivos .....	41
9.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico.....	41
9.3.3 Preparación del extracto.....	42
9.3.4 Rendimiento de extracción de sólidos.....	43
9.3.5 Contenido total de polisacáridos .....	43
9.3.6 Identificación y cuantificación de florotaninos en extractos de algas. ....	43
9.4 Resultados .....	45

9.4.1 Efecto de los parámetros de extracción en el rendimiento de extracción de sólidos.....	45
9.4.2 Efecto de los parámetros de extracción en el rendimiento de extracción de polisacáridos .....	49
9.4.3 Efecto de los parámetros de extracción en el rendimiento de extracción de florotaninos .....	51
9.4.4 Optimización de los parámetros de extracción y validación del modelo. ....	53
9.4.5 Identificación de florotaninos presentes en los extractos.....	53
9.5 Discusión .....	54
<b>10. CAPITULO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIOTICO DEL EXTRACTO OPTIMIZADO Y SU FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS.....</b>	<b>59</b>
10.1 Resumen.....	59
10.2 Introducción .....	59
10.3 Materiales y Métodos.....	62
10.3.1 Alga y reactivos .....	62
10.3.2 Extracción y preparación de la fracción de polisacáridos .....	63
10.3.3 Digestión gastrointestinal y fermentación colónica <i>in vitro</i> .....	63
10.3.4 Extracción de ADN y secuenciación de Illumina .....	64
10.3.5 Recuento de poblaciones microbianas mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) .....	66
10.3.6 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta.....	67
10.3.7 Identificación y cuantificación de florotaninos.....	67
10.3.8 Cuantificación de carbohidratos.....	68
10.3.9 Análisis estadístico .....	68
10.4 Resultados .....	69
10.4.1 Cambios en las bacterias totales y la diversidad beta de las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal humana.....	69
10.4.2 Efecto de los sustratos de algas marinas sobre la composición de la microbiota intestinal humana y la cuantificación de cepas probióticas seleccionadas .....	71
10.3.3 Síntesis de ácidos grasos de cadena corta.....	73
10.3.4 Cuantificación de florotaninos durante la fermentación <i>in vitro</i> .....	77
10.3.5 Cuantificación de carbohidratos durante la fermentación <i>in vitro</i> .....	78
10.4 Discusión .....	79
<b>11. CAPITULO 3: MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Silvetia compressa</i> .....</b>	<b>85</b>
11.1 Resumen.....	85

<b>11.2 Introducción .....</b>	<b>86</b>
<b>11.3 Materiales y Métodos.....</b>	<b>89</b>
11.3.1 Alga y reactivos .....	89
11.3.2 Preparación del extracto y de las soluciones alimentadas al secador .....	89
11.3.4 Secado por aspersión .....	90
11.3.5 Recuperación de producto.....	90
11.3.6 Contenido de Humedad .....	90
11.3.7 Higroscopia .....	91
11.3.8 Densidad aparente aireada y densidad aparente compacta .....	91
11.3.9 Propiedades de Fluidéz .....	92
11.3.10 Solubilidad .....	92
11.3.11 Diseño experimental y análisis estadístico.....	93
<b>11.4 Resultados .....</b>	<b>93</b>
11.4.1 Recuperación de producto.....	93
11.4.2 Contenido de humedad .....	94
11.4.3 Higroscopia .....	95
11.4.4 Densidad aparente aireada y densidad aparente compactada .....	96
11.4.5 Propiedades de fluidez .....	97
11.4.6 Solubilidad .....	98
<b>11.5 Discusión .....</b>	<b>99</b>
<b>12. CONCLUSIONES.....</b>	<b>104</b>
<b>13. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>106</b>
<b>14. ANEXOS .....</b>	<b>107</b>
14.1 Portada Artículo: “Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides form <i>Silvetia compressa</i> (Phaeophyceae) .....	107
14.2 Portada Artículo: “Effects of phlorotannin and polysaccharide fractions of brown seaweed <i>Silvetia compressa</i> on human gut microbiota composition using an in vitro colonic model. ....	108
<b>15. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>109</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Variables independientes y los niveles seleccionados para el diseño Box- Behnken .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 2:</b> Diseño Box-Behnken con la codificación de las variables independiente y sus resultados.....	41
<b>Tabla 3:</b> Coeficientes de regresión y coeficientes de determinación $R^2$ de los modelos polinomiales de obtenidos para las variables de respuesta para los extractos de S. compressa....	48
<b>Tabla 4:</b> Florotaninos identificados en los extractos de S. compressa utilizando HPLC-DAD y HPLC-MS-TOF.....	54
<b>Tabla 5: Rendimiento de producto .....</b>	<b>94</b>
<b>Tabla 6: Contenido de humedad de los productos obtenidos .....</b>	<b>95</b>
<b>Tabla 7: Higroscopía de los polvos obtenidos.....</b>	<b>96</b>
<b>Tabla 8: Densidad aparente aireada y compactada de los polvos obtenidos.....</b>	<b>97</b>
<b>Tabla 9: Propiedades de fluidez.....</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1: Superficies de respuesta en tres dimensiones del rendimiento de extracción (g EXT g as<sup>-1</sup>) del extracto de <i>S. compressa</i>:</b> Muestra el efecto de interacción de la temperatura (X <sub>1</sub> , °C), la densidad de poder (X <sub>2</sub> , W cL <sup>-1</sup> ), la relación solvente/alga (X <sub>3</sub> , mL g as <sup>-1</sup> ) y la concentración de etanol (X <sub>4</sub> , %) sobre la variable de respuesta. ....	47
<b>Figura 2: Superficies de respuesta en tres dimensiones del rendimiento de extracción de polisacáridos (g PS g as<sup>-1</sup>) de <i>S. compressa</i>:</b> Muestra el efecto de interacción de la temperatura (X <sub>1</sub> , °C), la densidad de poder (X <sub>2</sub> , W cL <sup>-1</sup> ), la relación solvente/alga (X <sub>3</sub> , mL g as <sup>-1</sup> ) y la concentración de etanol (X <sub>4</sub> , %) sobre la variable de respuesta. ....	50
<b>Figura 3: Superficie de respuesta en 3D para el rendimiento de extracción de florotaninos (mg PGE g as<sup>-1</sup>) de <i>S. compressa</i>.</b> Muestra el efecto interactivo de la temperatura (X <sub>1</sub> , °C), la densidad de poder (X <sub>2</sub> , W cL <sup>-1</sup> ), la relación solvente/alga (X <sub>3</sub> , mL g as <sup>-1</sup> ) y la concentración de etanol concentración (X <sub>4</sub> , %) .....	52
<b>Figura 4: Cromatograma del extracto del alga parda <i>S. compressa</i> registrado a 270 nm.</b> Identificación de los picos: (1) dihidroxitetrafulalol, (2) ácido quinico, (3) 7-phloroeckol, (4) derivado acetina, (5) .....	53
<b>Figura 5:</b> Recuento total de bacterias obtenido por RT-PCR (I), Beta diversidad mediante análisis de coordenadas principales (PCoA) de comunidades bacterianas de fermentaciones colónicas in vitro del extracto hidroetanólico de <i>Silvetia compressa</i> (EXT), su fracción de polisacárido aislado (PS), inulina ( INU) y control negativo (CTRL) (II) y (III) Análisis de clúster que muestra los resultados contrastantes entre CTRL e INU. ....	70
<b>Figura 6:</b> Cambios en la composición de la microbiota intestinal humana durante las fermentaciones colónicas in vitro del extracto hidroetanólico de <i>Silvetia compressa</i> (EXT), su fracción de polisacáridos aislados (PS), inulina (INU) o un control negativo (CTRL) a nivel filo (I), familia (II) y género (III). ....	72
<b>Figura 7:</b> Abundancia absoluta log <sub>10</sub> (X + 1) del género <i>Bifidobacterium</i> durante la fermentación colónica in vitro del extracto hidroetanólico (EXT) de <i>Silvetia compressa</i> , su fracción de polisacárido aislado (PS), inulina (INU) o un control negativo (CTRL) (I-A) y cuantificación mediante RT-PCR (I-B) y abundancia absoluta log <sub>10</sub> (X + 1) del género <i>Lactobacillus</i> (II-A) y cuantificación mediante RT-PCR (II-B). ....	75

**Figura 8:** Cambios en las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta más abundantes (AGCC) [I. Concentración total de AGCC, II. Ácido acético y III. Ácido propiónico y IV. Ácido butírico] durante la fermentación colónica in vitro del extracto hidroetanólico (EXT) de *Silvetia compressa*, su fracción de polisacáridos aislada (PS), inulina (INU) o un control negativo (CTRL). .....76

**Figura 9:** Cromatogramas obtenidos a 270 nm que muestran los cambios en las concentraciones del derivado de acetina (1), eckstolonol (2) y dieckol (3) en los sobrenadantes obtenidos a 0 (I), 8 (II) y 48 h (III) de la fermentación colónica in vitro del extracto hidroetanólico (EXT) de *Silvetia compressa* y los cambios expresados por gramo de heces utilizadas como inóculo (IV). .....77

**Figura 10:** Cromatogramas obtenidos por HPLC-IR que muestran las diferencias en las concentraciones de glucosa (1), galactosa (2), manosa + arabinosa + fucosa (MAF) (3) y manitol (4) en los sobrenadantes de las fermentaciones colónicas in vitro del extracto hidroetanólico de *Silvetia compressa* (EXT) a la 0 h ( $t_0$ ) y 48 h ( $t_{48}$ ) (I) y cambios expresados por gramo de heces utilizadas como inóculo para la fermentación EXT de 48 h (II), Cromatogramas obtenidos para la fracción de polisacáridos aislados (PS) (III) y los correspondientes cambios de concentración durante las 48 horas de fermentación (IV). .....78

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

Símbolo / Abreviatura	Definición
EAU	Extracción asistida con ultrasonido
SA	Secado por aspersión
ME-SA	Microencapsulación mediante secado por aspersión
SDR	Superficie de respuesta
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos
MS-TOF	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo
PT	Florotaninos
PS	Polisacáridos
W	Watt
cL	Centilitro
mL	Mililitro
mg	Miligramo
g	Gramo
g as	Gramo alga seca
BBD	Diseño experimental Box-Behnken
<i>S. compressa</i>	<i>Silvetia compressa</i>
EXT	Extracto hidroetanólico
EFG	Equivalentes de floroglucinol
Y <sub>1</sub>	Rendimiento de extracción de sólidos
Y <sub>2</sub>	Rendimiento de extracción de polisacáridos
Y <sub>3</sub>	Rendimiento de extracción de florotaninos
ESI	Ionización por electrospray
X <sub>1</sub>	Temperatura de extracción
X <sub>2</sub>	Densidad de potencia
X <sub>3</sub>	Relación solvente de extracción/ alga marina seca
X <sub>4</sub>	Concentración de etanol en el solvente de extracción
EtOH	Etanol
FC	Método Folin-Ciocalteu
CFT	Contenido de compuestos fenólicos totales
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
UFC	Unidades formadoras de colonias
μmol	Micromol
MIH	Microbiota intestinal humana
INU	Inulina
CTRL	Tratamiento control negativo en fermentación colónica <i>in vitro</i>
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de flama
HPLC-IR	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

<b>Símbolo / Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
MAF	Fracción cromatográfica correspondiente a la manosa, arabinosa y fucosa
EAG	Equivalentes de ácido gálico
HPMC	Hidroxipropil metil celulosa
MD	Maltodextrina
Glu	Glucosa
Gal	Galactosa
Mani	Manitol
GA	Goma arábica
HPBCD	Hidroxipropil beta ciclodextrina
WP	Proteína de suero
Ec	Ecuación
HR	Índice de Haussner
IC	Índice de Carr
T <sub>i</sub>	Temperatura de entrada a la cámara del secador por aspersión
T <sub>o</sub>	Temperatura de salida de la cámara del secador por aspersión
Ca	Acarreador



## 1. RESUMEN

El alga parda *S. compressa* es un organismo ampliamente distribuido a lo largo de la costa del pacífico, desde Punta Baja en Baja California México hasta Humbolt County en California Estados Unidos. Investigaciones previas han determinado los beneficios potenciales de esta alga en la salud, como actividades hipoglicémicas e hipocolesterolémicas, así como actividades antivirales. Esto sumado al actual reconocimiento de las algas como una fuente rica de compuestos nutraceuticos con una amplia gama de bioactividad convierten a *S. compressa* en un caso de estudio atractivo para la generación de productos biotecnológicos de alto valor. Las bondades de esta alga se atribuyen a su contenido de compuestos fenólicos y fibra soluble (florotaninos y polisacáridos), de ahí la necesidad de maximizar la extracción de ambas familias de compuestos químicos utilizando una tecnología emergente como la extracción asistida con ultrasonido, para después evaluar la bioactividad del extracto resultante. La presente investigación, tiene como objetivos desarrollar un ingrediente funcional a base del alga *S. compressa* mediante (1) la optimización del proceso de extracción de los principales compuestos bioactivos presentes en el alga, (2) la determinación su potencial efecto prebiótico y (3) la estabilización del extracto bioactivo mediante microencapsulación con secado por aspersión. Se realizó un diseño experimental Box-Behnken para la optimización del proceso de extracción asistida con ultrasonido, se implementó una metodología *in vitro* para el estudio del impacto del extracto y su fracción de polisacáridos aislados en las comunidades de bacterias de la microbiota intestinal humana y posteriormente mediante un diseño factorial preliminar se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas del polvo microencapsulado del extracto optimizado.

Se encontró que el ultrasonido tiene un efecto significativo en la liberación de los florotaninos del alga y que la concentración de etanol impacta significativamente el contenido de polisacáridos presentes en el extracto final. Los rendimientos experimentales de florotaninos y polisacáridos fueron de 0.73% y 23% (p / p), respectivamente. La extracción de florotaninos se mejoró significativamente por la densidad de potencia del ultrasonido, mientras que la extracción de polisacáridos mejoró cuando se usó una concentración baja de etanol en el solvente.

Al utilizar el extracto como sustrato para el modelo de fermentación colónica *in vitro* se observó un potencial efecto prebiótico, similar al de la inulina (prebiótico control). El extracto y su fracción aislada de polisacáridos promovieron la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético y ácido propiónico, principalmente). Además, propiciaron el desarrollo de géneros de probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se determinó que los florotaninos y el manitol, presentes en ambas fracciones fermentadas tienen un importante rol en el desarrollo diversas bacterias de microbiota intestinal humana ya que son agotados después de las primeras ocho horas de fermentación. Anteriormente no existían reportes del consumo de florotaninos o manitol por parte de consorcios de microbiota intestinal humana.

La microencapsulación permitió obtener elevados rendimientos de producción, y polvos con un bajo contenido de humedad residual. Los experimentos con HPMC/MD y MD/GA obtenidos a 180°C permitieron obtener rendimientos de hasta 86%.

Los hallazgos clave logrados a partir de este trabajo contribuyen a desarrollar y expandir una nueva plataforma de utilización de algas marinas para productos de mayor valor, en particular para las industrias de alimentos funcionales y nutraceuticos, con el fin de satisfacer la demanda social de conciencia sobre la salud y apoyar el desarrollo económico.

## 2. ABSTRACT

The brown seaweed *S. compressa* is a widely distributed organism along the Pacific coast, from Punta Baja in Baja California Mexico to Humbolt County in California United States. Previous research has determined the *in vitro* potential health benefits of this algae, such as hypoglycemic and hypocholesterolemic activities, as well as antiviral activities. This research added to the current recognition of seaweeds as a rich source of nutraceutical compounds with a wide range of bioactivity; make *S. compressa* an attractive case study for the generation of high-value biotech products. The benefits of this algae are attributed to its content of phenolic compounds and soluble fiber (florotannins and polysaccharides), thus the need to maximize the extraction of both families of chemical compounds using an emerging technology such as ultrasound assisted extraction, to later evaluate the bioactivity of the resulting extract. The present research aims to generate the development of a functional ingredients and functional foods based on the algae *S. compressa* by (1) optimizing the extraction process of the main bioactive compounds present in the algae, (2) determining its potential prebiotic effect and (3) stabilization of the bioactive extract by microencapsulation using spray drying. For this purpose, a Box-Behnken experimental design was made for the optimization of the ultrasound-assisted extraction process, an *in vitro* methodology was implemented to study the impact of the extract and its fraction of isolated polysaccharides in the bacterial communities from the human intestinal microbiota and subsequently by means of a preliminary factorial design the physicochemical properties were obtained for the microencapsulated powders from the optimized extract.

It was found that ultrasound has a significant effect on the release of phlorotannins from the seaweed and that the concentration of ethanol significantly impacts the content of polysaccharides present in the final extract. The experimental yields of phlorotannins and polysaccharides were 0.73% and 23% (p / p), respectively. The extraction of phlorotannins was significantly improved by ultrasound power density, while the extraction of polysaccharides was improved when low concentrations of ethanol were used in the solvent.

When using the optimized extract as a substrate for the *in vitro* colonic fermentation model, a potential prebiotic effect was observed, similar to that of inulin (prebiotic control). The optimized extract and its isolated polysaccharide fraction promoted the synthesis of short-chain fatty acids (mainly acetic acid and propionic acid). In addition, they promoted the development of probiotic genera such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. It was determined that the phlorotannins and mannitol present in both fermented fractions have an important role in the development of various human intestinal microbiota bacteria as they are depleted after the first eight hours of fermentation. Previously, there were no reports of the consumption of phlorotannins or mannitol by consortia of human intestinal microbiota.

Microencapsulation made it possible to obtain high production yields and powders with a low residual moisture content. The experiments with HPMC / MD and MD / GA obtained at 180 ° C allowed to obtain yields of up to 78.33%.

The key findings from this work contribute to developing and expanding a new platform for the use of seaweed for higher value products, in particular for the functional food and nutraceutical industries, in order to meet the social demand for awareness about health and support economic development.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 *Silvetia compressa* y las algas pardas.

Las algas pardas son organismos ampliamente extendidos en las costas de México, mayoritariamente en las costas de Baja California. La industria relacionada con el cultivo de algas y su transformación provee una amplia gama de productos de consumo humano directo e indirecto, se estima que este mercado alcanzó un valor de 11.5 billones de dólares en 2020 (Imarc Group 2021). La producción intensificada de algas (acuicultura) es escasa fuera de Asia, por lo que en otros países se recurre a la cosecha del alga silvestre.

América Latina cuenta con un estimado de 4.6 a 8.7% del total de las especies de macroalgas marinas donde el mayor productor es Chile, que en el año 2011 cosechó el 51.3% de la cosecha mundial (FAO, 2016). La cosecha de algas en México se basa prácticamente en la recolección. La explotación principal de algas se da en la costa de la península de Baja California y en el interior del golfo de Baja California. Las cuatro variedades de algas cafés que más se colectan en las costas de México son *Macrocystis pyrifera*, *Gelidium robustum*, *Chondracanthus canaliculatus* y *Gracilariopsis lemaneiformis* (Valderrama et al. 2013). La extracción nacional de algas ha ido en constante disminución. La SAGARPA reporta una cosecha de aproximadamente 11,500 toneladas anuales en el periodo 2013 – 2016 (Vázquez-Delfín et al. 2019). Se han registrado diversos esfuerzos para el cultivo de macroalgas en México, incluyendo ensayos a escala piloto en tanques terrestres, zonas intermareales y granjas cercanas a las costas. La abundancia de agarofitas y sus características físicas han hecho a las costas de Quintana Roo y Mérida candidatos atractivos para la explotación de algas marinas y el establecimiento de centros productivos (Vázquez-Delfín et al. 2019). Actualmente diversas líneas de investigación buscan el desarrollo de productos a base de algas y el aprovechamiento de los recursos presentes en las costas mexicanas, un ejemplo es la domesticación de *Eisenia arborea* como sustituto de *Macrocystis pyrifera* para la alimentación del abulón rojo (Alemañ et al. 2019). Esfuerzos como estos sientan las bases para la mejora y establecimiento de un cultivo intensificado y estandarizado de algas.

En la actualidad la búsqueda de potenciales fármacos para la atención de las enfermedades que aquejan a la sociedad actual ha virado hacia la obtención de compuestos funcionales

a partir de fuentes menos tradicionales (no convencionales). La heterogeneidad de organismos marinos y la diversidad de ecosistemas que presentan los océanos ha derivado en el descubrimiento de compuestos naturales con actividades contra enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares e inclusive virales (Plaza et al. 2010). Múltiples líneas de investigación han encontrado en algas pardas compuestos naturales que pueden atenuar la obesidad (fucoxantinas) (Balboa et al. 2013), disminuir las altas concentraciones de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre (fucooidan, laminaranos y florotaninos) (Wijesekara et al. 2011a; Wijesinghe y You-Jin 2012; Ermakova et al. 2013). El descubrimiento de estos compuestos convierte a las algas cafés en una materia prima potencial para el desarrollo de un ingrediente activo. Mediante el uso de la biotecnología e ingeniería de procesos es posible obtener un ingrediente activo estable para el combate de factores de riesgo relacionados con el síndrome metabólico y mantenimiento de la salud intestinal.

## 4. ANTECEDENTES

*Silvetia compressa* es un alga parda común en la zona de marea media alta en costas rocosas desde Shelter Cove, condado de Humboldt, California, hasta justo al sur de Punta Baja, Baja California, incluyendo todas las islas costeras excepto los Farallons (Silva et al. 2004). Previamente fue conocida como *Pelvetia compressa* o *Pelvetia fastigiata*. El género *Silvetia* fue creado para diferenciar las especies de *Pelvetia* de la costa oeste de Norteamérica de aquellas especies endémicas de las costas europeas; con base a caracteres anatómicos, morfológicos y moleculares (Aguilar-Rosas et al. 2002). Diversos organismos del género *Silvetia* son considerados como algas comestibles, *Silvetia babingtonii* se utiliza para productos alimenticios en Japón y Corea, especialmente para la fabricación de sales de potasa, *Silvetia siliquosa* es utilizada en China y Corea para la elaboración de alimentos y para la extracción de alginatos (Pereira 2016). Diversos trabajos previos han establecido el potencial nutracéutico de *S. compressa*, gracias a su contenido de moléculas biológicamente activas como polifenoles y fibra dietaria (Múzquiz et al. 2019; Tapia-Salazar et al. 2019). Extractos de *S. compressa* han presentado actividades inhibitoras de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, actividades antioxidantes y antivirales (Morán-Santibañez et al. 2016; Múzquiz et al. 2019); incluso recientemente en un estudio *in vivo* con ratas wistar alimentadas con dieta alta en grasas suplementada con 2.5% de harina de *S. compressa* se redujo 18% el colesterol total y 54% las lipoproteínas de baja densidad en suero en comparación con el control (Acevedo-Pacheco et al. 2020).

### 4.1 Polisacáridos y florotaninos moléculas bioactivas presentes en algas pardas.

Los polisacáridos son componentes muy abundantes en las macroalgas, tienen principalmente funciones de almacenamiento de energía y estructurales. Los polisacáridos de almacenamiento incluyen almidón “real” en las algas verdes, almidón floridano (que exhibe una estructura similar a la amilopectina y no contiene amilosa) en las algas rojas y laminaran en las algas pardas (Usov y Zelinsky 2013). Los polisacáridos estructurales presentes en la pared celular de las algas consisten en compuestos insolubles en agua de alto peso molecular (principalmente celulosa, xilanos y mananos) e hidrosolubles como agar, carragenina, alginato, fucoidan y ulvan, que representan la gran mayoría de la fibra dietética soluble presente en las algas. Estos polisacáridos están formados por unidades

repetidas de azúcares neutros y ácidos unidos por enlaces glicosídicos específicos (Usov y Zelinsky 2013). Los enlaces glicosídicos, la composición de monosacáridos, el peso molecular y el contenido de sulfato pueden diferir para el mismo polisacárido, dependiendo de la especie de alga y el tiempo de recolección.

Los polisacáridos estructurales como agar y alginato son extensamente utilizados como agentes estabilizantes y espesantes en varios sectores industriales como el farmacéutico, papelerero y alimenticio (Mayakrishnan et al. 2013). El alginato es el principal polisacárido de las algas pardas, que contiene ácido polimanurónico, ácido poligulurónico y una mezcla de ácido polimanurónico y ácido poligulurónico de estructura lineal (también denominado ácido algínico). El alginato está disponible no solo en forma de ácido, sino también en forma de sal (considerado un componente importante de la pared celular) (Borba et al. 2019). El laminaran, otro polisacárido de almacenamiento propio de las algas pardas se describe como el único polisacárido de almacenamiento soluble no digerible que se encuentra en las algas pardas. Está formado por una estructura lineal de 20 a 30 residuos de D-glucopiranososa enlazada con  $\beta$  - (1-3) con algunas cadenas laterales aleatorias de  $\beta$  - (1-6) -D-glucopiranososa (Gotteland et al. 2020). El laminaran se encuentra en las frondas de los géneros *Laminaria* y *Saccharina* y en menor medida en *Ascophyllum*, *Fucus*, y *Undaria* (Kadam, Álvarez, et al., 2015).

El principal polisacárido sulfatado en algas pardas es el fucoidan, el ulvan en algas verdes y carragenano en algas rojas (Wijesekara et al. 2011b). Fucoidan es un término utilizado para describir un grupo de polisacáridos sulfatados con alto contenido de fucosa y menor cantidad de otros monosacáridos como galactosa, manosa, glucosa y ácidos urónicos (Okolie et al. 2019). Estas biomoléculas están incrustadas en las paredes de las células fibrilares y los espacios intercelulares de las algas pardas. El fucoidan consiste principalmente en residuos de L-fucopiranososa ligados a  $\alpha$ - (1,3) y  $\alpha$ - (1,4) lineales o alternados que pueden sulfatarse en C-2 o C-4 pero rara vez en C-3 (Ale et al. 2011). Se ha corroborado la actividad antihipercolesterolemia de los polisacáridos sulfatados en ratones (Pengzhan et al. 2003). Estos polisacáridos reducen el nivel del colesterol en plasma interactuando con las sales biliares evitando la absorción del colesterol a nivel intestinal. Esta interacción reduce los niveles sanguíneos de LDL y VLDL (Leiro et al.



2007). Otros estudios han revelado que los polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular tienen diversos efectos antihiperlipémicos como inhibición de  $\alpha$ -amilasa y aumento del transporte de glucosa mediante activación de la cascada de señalización inducida por translocación (Wang et al. 2016).

Los florotaninos son compuestos fenólicos sintetizados por las algas pardas (*Phaeophyta*). Son altamente hidrofílicos y sus pesos moleculares oscilan entre los 126 y 650 kDa (Thomas y Kim 2011). Los florotaninos se generan mediante reacciones de polimerización de floroglucinol, se dividen en cuatro clases debido a sus enlaces: (1) éter (fuhaloles y floretoles), (2) fenil (fucos), (3) éter-fenil (fucofloretoles) y (4) dibenzodioxin (eckoles y carnaloles) (Kim et al. 2013). Actualmente su rol biológico no está dilucidado completamente, pero se cree que tienen funciones antioxidantes en la pared celular y de protección contra especies herbívoras (Shrestha et al. 2021). Esta familia de polifenoles tiene un amplio espectro de bioactividad, se ha reportado actividad antioxidante, antidiabética, anticáncer, antiviral, neuro-protectora (Wijesekara et al. 2011a; Eom et al. 2012).

#### **4.2 Tecnologías y técnicas para la extracción de polisacáridos y florotaninos**

Los procesos para la obtención de biomoléculas presentes en algas (polisacáridos y/o florotaninos) son bioprocesos que generalmente constan de numerosas etapas; de manera general pueden considerarse tres grandes etapas: (1) pretratamiento del alga, (2) tecnología de extracción y (3) purificación de las biomoléculas extraídas, dependiendo de la pureza deseada la complejidad del aislamiento de los polisacáridos y florotaninos puede variar; haciendo más compleja la etapa de purificación. La etapa de pretratamiento permite acondicionar el alga para eficientizar el proceso de extracción y remover parcialmente contaminantes del alga, generalmente esto incluye la limpieza del alga con agua marina o destilada para la remoción de arena y epifitos; seguida de una deshidratación (lío-filización o secado) y molienda; que tiene como objetivo reducir el tamaño de partícula para maximizar la extracción de los componentes presentes en el alga.

Las tecnologías de extracción utilizadas para la obtención de extractos ricos en polisacáridos pueden ser las tradicionales (extracción con solvente como maceración, percolación, etc.) y/o emergentes (extracción asistida con ultrasonido, extracción asistida

con microondas y extracción asistida con enzimas, etc.). La extracción de polisacáridos de algas generalmente se lleva a cabo utilizando extracción con solventes en conjunto con alga pretratada (deshidratada, pulverizada y/o desgrasada). Las condiciones de extracción pueden variar con tiempos de extracción desde 4 horas hasta días. La temperatura de extracción varía desde 20-21°C hasta 120°C por varias horas. Los solventes de extracción más utilizados son agua y etanol, además se han descrito algunas variantes utilizando condiciones acidificadas. Una vez realizada la extracción y la remoción de los restos de biomasa, dependiendo del polisacárido de interés es posible plantear un protocolo de purificación utilizando el extracto clarificado. Inicialmente se puede precipitar el alginato (utilizando  $\text{CaCl}_2$  o sales de magnesio) para después utilizar un solvente orgánico como etanol para obtener los polisacáridos restantes (laminaran y/o fucoidan) (Garcia-Vaquero et al. 2017).

La extracción de compuestos fenólicos (entre ellos florotaninos) se ha realizado principalmente utilizando técnicas de extracción sólido-líquido tradicionales (maceración, soxhlet, etc.) utilizando solventes orgánicos puros (acetona, etanol y metanol) o mezclados con agua destilada (Kadam et al. 2015a). Actualmente la extracción de florotaninos ha sido ensayada utilizando diferentes algas pardas como caso de estudio, probando métodos de extracción emergentes como extracción con fluidos supercríticos con *Sacharina japonica* (Saravana et al. 2017), extracción asistida por ultrasonido utilizando *Ascophyllum nodosum* (Kadam et al. 2015b), extracción asistida por enzimas con *Sargassum muticum* (Rodrigues et al. 2015), o utilizando extracción líquida presurizada (Herrero et al. 2015); la aplicación de estas tecnologías tanto en las industrias alimenticia, nutraceútica, cosmética y farmacéutica aun no es completa, debido a la baja disponibilidad de equipos y elevados costos. La purificación de los florotaninos posterior a su extracción se ha investigado utilizando (1) técnicas de extracción basadas en la polaridad de los florotaninos como la extracción líquido-líquido y sólido-líquido (como la extracción en fase sólida), (2) técnicas de exclusión por tamaño utilizando membranas de ultrafiltración por diálisis o presurizadas y (3) técnicas de alta resolución como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Gall et al. 2015).

La efectiva extracción de los polisacáridos y florotaninos (utilizando extractos metanólicos y etanólicos en conjunto con tecnologías tradicionales y diversas tecnologías emergentes (Kadam et al. 2013)) ha permitido evaluar su actividad biológica y determinar sus propiedades como antioxidantes, inmuno-modulantes, antihipercolesterolémicas y antihiperlipidémicas (Fisch et al. 2003; Leiro et al. 2007; Ahn et al. 2008; Liu et al. 2011; Thomas and Kim 2011; Wijesekara et al. 2011a; Wijesinghe y You-Jin 2012).

El alga parda *Silvetia compressa* es muy abundante en las costas de México y en estudios previos se ha determinado que sus extractos ricos en polisacáridos y florotaninos presentan capacidad antioxidante y la elevada actividad inhibitoria contra las enzimas de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (Múzquiz et al. 2019). Los resultados y metodologías reportadas por Múzquiz et al. (2019) son la primera parte de una serie de estudios de ingeniería de procesos para poder evaluar el verdadero potencial comercial y nutracéutico del alga *S. compressa*.

#### **4.3 Efecto prebiótico**

El concepto de prebiótico se refiere a los ingredientes alimentarios que no son hidrolizados por las enzimas pancreáticas e intestinales y llegan al colon donde son fermentados por la microbiota residente, estimulando selectivamente la multiplicación y / o actividad de una o varias poblaciones bacterianas promotoras de la salud (Gibson et al. 2017). Los compuestos prebióticos son en su mayoría carbohidratos solubles y no digeribles, pero estudios recientes sugieren otros fitoquímicos también podrían mostrar propiedades prebióticas (carotenoides y compuestos fenólicos) (Mosele et al. 2015b; Neri-Numa et al. 2020). Actualmente, en el mercado mundial se encuentran disponibles una gran diversidad de prebióticos, naturales o sintéticos, siendo los fructanos [inulina y fructooligosacáridos (FOS)] los más estudiados y utilizados en los alimentos (Verspreet et al. 2016). El efecto prebiótico está mediado exclusivamente por las actividades reguladoras del compuesto dietético en la microbiota intestinal y el consiguiente impacto positivo en la salud del huésped. Esto puede ocurrir estimulando el crecimiento de poblaciones bacterianas promotoras de la salud, incluidos los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila* o bacterias productoras de ácido butírico, y la posterior formación de metabolitos benéficos, principalmente ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Gotteland et al. 2020). Otro efecto positivo de la ingesta de un prebiótico

puede ocurrir al inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en el colon (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Shigella*, entre otros) (Gomez-Zavaglia et al. 2019), y / o la reducción de metabolitos como NH<sub>3</sub>, fenoles, p-cresol, escatol, sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) (Davila et al. 2013; Cires et al. 2019), o trimetil-amina que son potencialmente dañinos para la mucosa colónica y, cuando son absorbidos son dañinos para los riñones y el endotelio vascular.

Las algas marinas, en este caso las algas pardas; se presentan como una potencial fuente de compuestos prebióticos gracias a que son una fuente rica de carbohidratos solubles no digeribles. Las algas pardas presentan polisacáridos estructurales y de reserva capaces de resistir las enzimas digestivas y llegar prácticamente sin modificaciones al intestino grueso. El efecto que tienen estos polisacáridos y oligosacáridos derivados del alginato, fucoidan y agar es diverso y depende mucho del lugar origen del hospedero; se han obtenido resultados contrastantes entre hospederos de origen oriental y americano. Los extractos de algas pardas compuestos principalmente por polisacáridos derivados de alginato, fucoidan y agar de algas pardas como *Ecklonia radiata* (Charoensiddhi et al. 2017b), *Ascophyllum nodosum* (Okolie et al. 2019), *Laminaria digitata* (Strain et al. 2020), *Laminaria japonica* (Kong et al. 2016) y *Sargassum fusiforme* (Kong et al. 2021) han generado síntesis de ácidos grasos de cadena corta, mayoritariamente ácido acético y ácido propiónico, y en algunos casos también ácido butírico; además de la proliferación de géneros probióticos o potencialmente probióticos de la microbiota intestinal humana como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium*, entre otros.

El efecto prebiótico de los polifenoles está asociado con un mecanismo bacteriostático y de control de la proliferación de bacterias patógenas de los géneros *Escherichia*, *Bacillus spp* y *Clostridia*, cuya proliferación se ve beneficiada por dietas ricas en proteínas y está asociada con el síndrome del intestino irritable (Mosele et al. 2015a). Se han observado incrementos en la producción total de AGCC después de la fermentación *in vitro* de ácido clorogénico, ácido cafeico y quercetina (Mosele et al. 2016). Sin embargo, esto es contrastante con otros estudios *in vitro* donde las protoantocianidinas y las punicalaginas han suprimido la síntesis de AGCC (Bazzocco et al. 2008; Bialonska et al. 2010). Estos resultados opuestos han llevado a teorizar que el aumento de AGCC observados después

las fermentaciones *in vitro* de estándares de polifenoles puros probablemente esté relacionado con la fermentación de los restos glicósidos liberados y/o de los carbohidratos restantes en las heces (Mosele et al. 2016). En el caso de los florotaninos, al día de hoy no se encuentran reportes sobre su consumo de manera aislada en fermentaciones colónicas *in vitro* por parte de microbiota intestinal humana; sin embargo, existen reportes de extractos enriquecidos en florotaninos que mostraron: (1) reducción del peso molecular de los florotaninos para su absorción colónica (Corona et al. 2016; Corona et al. 2017) y (2) inhibición de bacterias patógenas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* y *Enterobacter*) (Charoensiddhi et al. 2017b).

#### **4.4 Extracción asistida con ultrasonido**

La metodología planteada por la investigación de Múzquiz et al. (2019) requiere optimizarse y complementarse, tanto en las etapas de extracción de los compuestos bioactivos como en la etapa de estabilización de los mismos. La etapa de extracción de los compuestos bioactivos presenta deficiencias en: (i) el correcto manejo de solventes y los desechos que estos generan y (ii) el uso no optimizado de tecnologías de asistencia para la liberación y ruptura celular como el ultrasonido, tecnología emergente que actualmente a nivel global comienza una etapa de escalamiento industrial (Chemat et al. 2017).

Usando extracciones asistidas con ultrasonido (EAS), las extracciones complejas y laboriosas ahora pueden completarse en minutos con alta reproducibilidad, reduciendo el consumo de solvente, simplificando la manipulación y el tratamiento, y consumiendo solo una fracción de la energía fósil que normalmente se necesita para un método de extracción convencional como la extracción Soxhlet o la maceración. Se han extraído, analizado y formulado eficazmente varias clases de componentes alimentarios como aromas, pigmentos, antioxidantes y otros compuestos orgánicos y minerales a partir de una variedad de matrices (principalmente tejidos animales, microalgas, levaduras, alimentos y materiales vegetales).

La EAS induce fenómenos en el medio, como el flujo acústico y la cavitación, que provocan una agitación intensa y una mejora de la transferencia de masa (Santos-Zea et al. 2018). Los fenómenos de cavitación conducen a fuerzas de esfuerzo cortante elevadas

en el medio/solvente de extracción. La implosión de burbujas de cavitación en la superficie de un producto da como resultado una micro-propulsión que genera varios efectos sobre la superficie como su pelado, erosión, descomposición y fragmentación. Estos efectos propician una mayor hidratación; generando aumentos del índice de extracción para muestras sonicadas en comparación con muestras sin tratamiento ultrasónico (Chemat et al. 2017). Además, la implosión de burbujas de cavitación en un medio líquido provoca macro-turbulencias y micro-mezclado que propician la transferencia de masa entre el solvente de extracción y la matriz. La EAS actúa a través de diversos mecanismos independientes o combinados como fragmentación, erosión, capilaridad, detexturación y sonoporación (Chemat et al. 2017).

La utilización de EAS ha sido utilizada previamente para la extracción de compuestos bioactivos de algas pardas, incluidos los florotaninos y polisacáridos. Otros autores han logrado optimizar la extracción de florotaninos utilizando EAS, con respecto a una extracción de maceración tradicional. Dang et al. (2017) lograron la optimización de extracción de florotaninos del alga *Hormosira banksii* utilizando una superficie de respuesta tomando como factores la densidad de poder, temperatura y tiempo de extracción; obteniendo extractos más concentrados (hasta un 146% más en comparación a la extracción convencional) y con mayor capacidad antioxidante, en un menor tiempo de extracción. Otras líneas de investigación han reconocido la EAS como una operación unitaria capaz de eficientizar extracciones, disminuyendo los tiempos de operación; Lee et al. (2013) reportan la optimización de extracción de florotaninos totales del alga *Ecklonia cava*, donde redujeron hasta 12 h el tiempo de extracción utilizando EAS en comparación a extracción convencional por maceración.

Los polisacáridos de algas marinas también han sido caso de estudio para la implementación de EAS, Rodrigues et al (2015) obtuvieron extractos concentrados en polisacáridos sulfatados de *Sargassum muticum* ( $10.01 \pm 0.27 \text{ mg g}_{\text{ext}}^{-1}$ ), con una concentración significativamente mayor con respecto a extracciones asistidas con enzimas celulasas y proteasas ( $5.9 \pm 0.40$  y  $7.5 \pm 0.05 \text{ mg g}_{\text{ext}}^{-1}$ ) y tecnologías de extracción tradicional con agua caliente ( $9.05 \pm 0.05 \text{ mg g}_{\text{ext}}^{-1}$ ). Experimentos de optimización y modelación de procesos realizados por Kadam et al. (2015b) determinaron que el tipo de

solvente (agua destilada y 0.03M HCl) y la intensidad de ultrasonido afectan el perfil de liberación de compuestos del alga *Ascophyllum nodosum* al solvente de extracción. Con la aplicación de ultrasonido lograron incrementar la extracción de compuestos fenólicos totales, ácidos urónicos y fucosa con respecto a la extracción convencional con agua caliente de  $79.28 \pm 0.42$  a  $82.70 \pm 0.96$  mg EAG g<sub>ext</sub><sup>-1</sup>,  $70.69 \pm 0.33$  a  $128.07 \pm 4.89$  mg g<sub>ext</sub><sup>-1</sup> y  $96.79 \pm 1.21$  a  $138.41 \pm 0.98$  mg/g<sub>ext</sub><sup>-1</sup> respectivamente.

#### **4.5 Secado por aspersión y microencapsulación**

El secado por aspersión es una operación unitaria enfocada a la remoción de agua y la producción de polvos con bajo contenido de humedad. Como técnica, el secado por aspersión se desarrolló en 1920 y se introdujo a las industrias láctea y de detergentes (van't Land 2012). En esta operación unitaria una solución es alimentada y atomizada en una cámara donde fluye un gas caliente y se obtiene polvo instantáneamente. El gas que generalmente se utiliza es aire o en ocasiones un gas inerte como nitrógeno. La alimentación líquida al secador puede ser una solución, una emulsión o una suspensión. Es posible obtener polvos de diversas granulometrías (10-50 µm hasta 2-3 mm de diámetro) dependiendo las condiciones de operación y de los sólidos presentes en la alimentación líquida (Gharsallaoui et al. 2007). El secado por aspersión consta de cuatro fases principales: (1) atomización de la alimentación, (2) evaporación del agua libre, (3) evaporación del agua ligada y (4) recuperación del producto (van't Land 2012).

El secado por aspersión es una operación muy utilizada en la industria alimenticia, particularmente en las industrias lácteas (producción de leche y café en polvo) y de pigmentos (van't Land 2012). Es muy utilizada en esta industria debido a que reduce el riesgo de degradaciones químicas o microbiológicas gracias a la disminución del contenido de agua y la actividad de agua en sus productos (Gharsallaoui et al. 2007). Actualmente diversas líneas de investigación buscan implementar esta tecnología como una alternativa para aumentar la vida de anaquel de jugos concentrados y alimentos ricos en azúcar, además de reducir los costos de logística en transporte y almacenaje de se derivan de estos productos (Bhandari et al. 1997; Adhikari et al. 2004; Cano-Chauca et al. 2005; Bhusari et al. 2014a).

Como se mencionó con anterioridad, dando seguimiento a los resultados presentados por Múzquiz et al. (2019), las dificultades de manejar extractos concentrados de alga son (i) la pérdida gradual de las propiedades de inhibición enzimática de los mismos y (ii) la tendencia de los extractos liofilizados a hidratarse debido a su elevado contenido de azúcares. Estos problemas pueden resolverse utilizando secado por aspersión ya que: (i) permite estabilizar los compuestos en una matriz de excipientes (microencapsulación) evitando que se oxiden o degraden (Ersus y Yurdagel 2007; Gharsallaoui et al. 2007; Janiszewska 2014; Koga 2015; Krishnaiah, Sarbatly, y Nithyanandam 2012) y (ii) la matriz de excipientes reduce la higroscopia de los sólidos resultantes, evitando que estos se contaminen con microorganismos y permitiendo que estos se mantengan más tiempo como un polvo granulado aumentando su vida de anaquel y vida útil (Fang y Bhandari 2011).

La microencapsulación mediante secado por aspersión (ME-SA) es un proceso de bajo costo que es comúnmente aplicado en la encapsulación de aceites, sabores y fragancias (Kwak 2014). El principio de la ME-SA está basado en el atrapamiento físico de los materiales encapsular por los acarreadores o materiales de membrana/pared mediante la rápida remoción de agua de una solución atomizada. La ME-SA se divide en tres etapas: (1) la preparación de la dispersión o emulsión a microencapsular (mezcla de acarreadores y material a encapsular), (2) la homogenización de la dispersión y (3) la atomización en la cámara de secado (Gharsallaoui et al. 2007; Kwak 2014; Bhusari et al. 2014b). Uno de los factores limitantes para el desarrollo de una buena microencapsulación es el acarreador por utilizar, generalmente se utilizan polímeros (maltodextrina) gomas (goma arábiga) o celulosas. El uso de uno u otro acarreador y su cantidad impacta fuertemente en el rendimiento del proceso y en las propiedades fisicoquímicas del polvo final (humedad, higroscopia, solubilidad, densidad, etc.). Las propiedades fisicoquímicas del polvo pueden afectar tanto la eficiencia de la microencapsulación como la estabilidad de los compuestos que se busca microencapsular. Diversas líneas de investigación se dedican a la constante búsqueda de nuevos acarreadores que permitan generar polvos microencapsulados con encapsulación selectiva y reducir los costos de operación y la degradación térmica de compuestos activos (Christensen et al. 2001; Şahin-Nadeem et al. 2013; Da Rosa et al. 2014; Ravichandran et al. 2014).



## 5. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto formó parte del proyecto interinstitucional (Conacyt) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) y es continuación de un proyecto doctoral previo donde se aislaron del alga *Silvetia compressa* extractos ricos en florotaninos y polisacáridos, con actividades antioxidantes e inhibidores de enzimas carbohidrasas con potencial nutracéutico antisíndrome metabólico. Es necesario el seguimiento y profundización de las perspectivas que se mostraron en ese proyecto, entre ellas están la optimización las condiciones de extracción para mejorar rendimiento de extracción de los florotaninos y polisacáridos, así como evaluar su potencial actividad prebiótica. A lo largo de este proyecto interinstitucional se presentaron problemas de estabilidad y dosificación en el uso de extractos de algas concentrados, particularmente del alga *S. compressa*, el secado por aspersión plantea generar una solución a estos problemas que se presentan en el desarrollo de un nutracéutico.

Este proyecto también busca profundizar en el efecto de los florotaninos y polisacáridos sobre las poblaciones bacterianas de microbiota intestinal humana. Se resalta la necesidad de entender la regulación de microbiota intestinal sana, favoreciendo el crecimiento de géneros probióticos e inhibiendo el desarrollo de patógenos gracias a estos compuestos. Actualmente hay una falta de información y resultados específicos sobre el efecto que tienen florotaninos identificados sobre consorcios intestinales/fecales obtenidos de microbiota intestinal humana. Si bien hay estudios previos con otras algas pardas, no hay estudios que describan el comportamiento o posible consumo de florotaninos específicos y los géneros bacterianos que se desarrollan a lo largo de una fermentación colónica.

La estabilización mediante microencapsulación con secado por aspersión permitirá resolver problemáticas ligadas al manejo y vida de anaquel de productos líquidos y a la higroscopicidad y al alto porcentaje de humedad presentes en los extractos del alga *Silvetia compressa* deshidratados por liofilización. Gracias a los bajos porcentajes de humedad presentes en los polvos microencapsulados (Gharsallaoui et al. 2007), el secado por aspersión de estos extractos permitirá aumentar la vida de anaquel de los compuestos

activos protegiéndolos de la degradación en almacén y facilitando su manejo para posteriores ensayos.

Se pretende que los resultados de esta investigación permitan el desarrollo de un producto estable a escala semicomercial y aporten al entendimiento del comportamiento de los florotaninos y polisacáridos presentes las algas cafés durante el proceso de microencapsulación. Estas propuestas de valor teórico buscan aterrizar en metodologías estandarizadas y replicables para la microencapsulación y obtención de una formula estable con polisacáridos y florotaninos bioactivos, que pueden derivar en el registro de propiedad intelectual.

## 6. HIPÓTESIS

- La optimización del proceso de extracción asistida con ultrasonido, utilizando un solvente hidroetanólico mediante una superficie de respuesta Box-Behnken, permitirá maximizar el rendimiento de extracción de florotaninos y polisacáridos del alga *Silvetia compressa*.
- Los florotaninos y polisacáridos presentes en el extracto presentarán un efecto prebiótico *in vitro* promoviendo la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y la proliferación de bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentes en la microbiota intestinal humana.
- Es factible estabilizar extracto activo utilizando microencapsulación mediante secado por aspersión con excipientes que permitan recuperar y retener los compuestos bioactivos.

## **7. OBJETIVO DEL TRABAJO**

Desarrollar un extracto prebiótico a partir del alga *Silvetia compressa*

## **8. OBJETIVOS PARTICULARES**

### **1) EXTRAER FLOROTANINOS Y POLISACÁRIDOS**

Optimizar las condiciones de la extracción etanólica asistida con ultrasonido para maximizar el rendimiento de extracción y el contenido de florotaninos y polisacáridos en extracto del alga *Silvetia compressa*.

### **2) EVALUAR EFECTO PREBIÓTICO**

Evaluar el efecto prebiótico *in vitro* del extracto optimizado y su fracción de polisacáridos utilizando consorcios microbianos fecales humanos, estudiando el desarrollo de bacterias probióticas *in vitro*.

### **3) ESTABILIZAR EL EXTRACTO MEDIANTE MICROENCAPSULACIÓN**

Evaluar la microencapsulación como método estabilizante para obtener un producto fisicoquímicamente estable, con un elevado porcentaje de retención de florotaninos y polisacáridos.

## 9. CAPITULO 1: OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDO DE FLOROTANINOS Y POLISACÁRIDOS DEL ALGA *S. compressa*.

### 9.1 Resumen

*Silvetia compressa* es un alga parda nativa de la costa de Baja California, México. Es una rica fuente de florotaninos y polisacáridos, dos familias de compuestos con importantes aplicaciones nutraceuticas. Las condiciones óptimas para la obtención de extractos altamente concentrados de florotaninos y polisacáridos de *S. compressa* se determinaron mediante el diseño experimental de Box-Behnken combinado con la metodología de superficie de respuesta (SDR). Se exploró el efecto de la temperatura de extracción ( $X_1$ : 50 – 65 ° C), la densidad de potencia del ultrasonido ( $X_2$ : 1.2 – 3.8 W cL<sup>-1</sup>), la relación solvente / alga ( $X_3$ : 10 – 30 mL g<sup>-1</sup> de alga seca) y la concentración de etanol en el solvente de extracción ( $X_4$ : 25-100% de etanol en agua) sobre el rendimiento de extracción florotaninos y polisacáridos. Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo polinomial de segundo grado, mientras que el ajuste del modelo se evaluó utilizando un análisis de varianza (ANOVA). A partir de este análisis, se determinaron las condiciones óptimas de extracción de florotaninos y polisacáridos para los parámetros evaluados ( $X_1$  = 50 ° C,  $X_2$  = 3.8 W cL<sup>-1</sup>,  $X_3$  = 30 ml g<sup>-1</sup> de alga seca y  $X_4$  = 32.33%). En estas condiciones, los rendimientos experimentales de florotaninos y polisacáridos fueron de 0.73% y 23% (p / p), respectivamente. La extracción de florotaninos se mejoró significativamente por la densidad de potencia del ultrasonido, mientras que la extracción de polisacáridos mejoró cuando se usó una concentración baja de etanol en el solvente, por lo que ambas familias de compuestos se obtuvieron combinando esos parámetros. Los datos experimentales coincidieron con las predicciones del modelo SDR, lo que indica la idoneidad del modelo obtenido y el éxito de la SDR en la optimización de las condiciones de extracción. Además, la identificación de los principales compuestos en el extracto de florotaninos se realizó por HPLC-MS-TOF; 10 de los 12 compuestos fenólicos identificados pertenecían a la familia de los florotaninos, 4 del grupo fuhalol, 5 son derivados del eckol y 1 es una subunidad de floroglucinol.

## 9.2 Introducción

En los últimos 20 años, las algas se han convertido en una fuente común de fitoquímicos (Plaza et al. 2008; Samarakoon y Jeon 2012; Rebours et al. 2014). Varios extractos de algas marinas de diferentes especies se utilizan como alimentos y aditivos en las industrias cosmética y alimentaria (Hifney et al. 2016). Los avances en fitoquímica han identificado varios géneros de algas marinas (por ejemplo, *Eisenia*, *Cystoseira*, *Macrocystis*, *Sargassum*, *Laminaria* y *Ascophyllum*) como posibles fuentes de compuestos químicos con aplicaciones nutracéuticas, farmacéuticas, prebióticas y cosméticas (Balboa et al. 2013). El efecto nutracéutico de las algas pardas se debe principalmente a dos familias de compuestos químicos: florotaninos (PT) y polisacáridos (PS). Las fracciones extraídas que contienen PT y PS, separados o en mezcla, han presentado actividades hipoglucémicas, hipolipidémicas, anticancer, antiviral, antibacterial, bacteriostáticas (Bogolitsyn et al. 2019), antioxidantes (Wijesekara et al. 2011a; Gil-Chavez et al. 2013) o bioactividad prebiótica (Charoensiddhi et al. 2016; Kong et al. 2016)

Los compuestos fenólicos del tipo PT están compuestos de unidades de floroglucinol unidas de diferentes maneras para formar diversas estructuras. Los PT son moléculas altamente hidrofílicas presentes en las algas pardas cuya función principal es protegerlas del estrés ambiental y del consumo por herbívoros (Wijesekara et al. 2011a). El contenido de PT varía mucho entre las especies de algas marinas, y las algas pardas tienen la mayor cantidad (0.5-15% de peso seco) (Pavia et al. 2003; Rajauria 2015). La extracción tradicional con solvente se ha utilizado para obtener extractos fenólicos y PT, principalmente utilizando etanol, metanol y acetona (Kadam et al. 2015a).

Las algas pardas tienen un contenido de PS que representa hasta el 76% del peso seco de algas (Rioux y Turgeon 2015). Las paredes celulares de las algas marinas difieren de las de las plantas terrestres, contienen poliurónicos y polisacáridos poco comunes que pueden estar metilados, acetilados, piruvilados o sulfatados (Wells et al. 2017). Los principales polisacáridos presentes en las paredes celulares de las algas pardas son el alginato de matriz intercelular (18 - 48% de peso seco) y los polisacáridos que contienen fucosa, como laminaran y fucoidan (2-10% de peso seco) (Rioux et al. 2007; Rioux y Turgeon 2015). El alginato es el principal PS comercial en las algas pardas, mientras que el fucoidan y la

laminaran representan un subproducto de la extracción de alginato (Wijesinghe y You-Jin 2012; Rioux y Turgeon 2015). Para la extracción de PS de algas pardas, se han creado varios métodos, pero el agua caliente tradicional y la extracción etanólica son los solventes más utilizados (Garcia-Vaquero et al. 2017).

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) es una tecnología emergente que acorta el tiempo de extracción de varias horas a minutos (Carrera et al. 2012; Živković et al. 2018) y puede reducir la cantidad de solvente utilizado (Kadam et al. 2015c; Chemat et al. 2017). La aplicación de ondas de ultrasonido al medio de extracción genera cavitación en el líquido, y la implosión de estas burbujas de cavitación produce erosión y descomposición de partículas (Grosso et al. 2015; Chemat et al. 2017). Recientemente, la EAU se ha utilizado para mejorar la extracción de varios compuestos bioactivos de las algas pardas, como PT (Lee et al. 2013; Kadam et al. 2015b; Kadam et al. 2015c; Rodrigues et al. 2015; Dang et al. 2017) y PS (Rodrigues et al. 2015; Garcia-Vaquero et al. 2017; Moreira et al. 2017).

*Silvetia compressa* es un alga parda comestible nativa de la costa norte de Baja California, México, y tiene aplicaciones industriales potenciales como fertilizante, forraje y como materia prima para la extracción de alginato y otros coloides empleados como espesantes en la industria alimentaria (Aguilar-Rosas et al. 2002). Las algas marinas del género *Silvetia* también se usan como ingredientes para la preparación de alimentos en los países asiáticos (Pereira 2016). Debido a su abundancia natural, varias líneas de investigación han estudiado el género *Silvetia* como modelo reproducción, así como sus aplicaciones industriales, nutraceuticas (antivirales, antioxidantes e hipoglucemiantes) y de biorremediación (Girardi et al. 2014; Morán-Santibañez et al. 2016; Múzquiz et al. 2019). Estudios anteriores mostraron que la extracción hidroetanólica de *S. compressa* en diferentes condiciones produjo rendimientos de extracción entre 18 y 37% (Múzquiz et al. 2019; Tapia-Salazar et al. 2019). Además, se han obtenido polifenoles con alta actividad antiviral (Morán-Santibañez et al. 2016), así como con actividades inhibitoras de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa y antioxidante (Múzquiz et al. 2019)

Dada la diversidad de variables seleccionadas resulta difícil establecer un modelo sencillo que prediga el comportamiento de este tipo de extracción. Por ello, para optimizar se

seleccionó un diseño experimental estadístico Box-Behnken, mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR), que se ha empleado en distintas disciplinas con resultados positivos, para determinar el impacto de la temperatura de extracción, la densidad de potencia, la relación solvente / alga y la concentración de etanol en los rendimientos de extracción de PT y PS del alga *S. compressa*.

Las metodologías de MSR permiten establecer modelos cuadráticos para la obtención de las condiciones críticas de los factores analizados (valor máximo o mínimo) (Ferreira et al. 2019). Las MSR más empleadas para la optimización de procesos son el diseño compuesto central (CCD), la matriz Doehlert (DM), el diseño factorial de tres niveles (3K) y los diseños Box-Behnken (BBD). Es necesaria la validación de los factores posterior a su proceso de optimización experimental mediante MSR, esta validación del modelo cuadrático puede realizarse mediante un análisis de varianza (ANOVA). Los diseños de Box-Behnken se utilizan para generar MSR de orden superior utilizando menos corridas que las requeridas un diseño de experimentos factorial normal. El diseño BBD disminuye las corridas experimentales en un intento por mantener la definición de superficie de orden superior. Los diseños de BBD colocan puntos en los puntos medios de los bordes de la región del diseño cúbico, así también en los puntos centrales (Rao and Kumar 2012). En este diseño, todos los factores se estudian con tres niveles, y el número de experimentos necesarios para obtener el modelo se define como  $N = 2k(k - 1) + Co$ , donde  $k$  es el número de factores y  $Co$  es el número de puntos centrales (Ferreira et al. 2019).

Para optimizar se seleccionó un diseño experimental estadístico BBD, mediante la aplicación de la metodología MSR que se ha empleado en matrices como *Sargassum* sp (extracción a nivel industrial de fucoïdan) y *Ascophyllum nodosum* (extracción de compuestos fenólicos, ácidos urónicos y fucosa) para la optimización de procesos y química analítica con resultados positivos. Este estudio buscó optimizar las condiciones de extracción de PT y PS para maximizar el rendimiento de ambas familias de compuestos. Además, estos métodos permiten el desarrollo de modelos estadísticos que pueden evaluar la relevancia, así como la significancia, de los efectos de cada factor y su interacción.



### 9.3 Materiales y Métodos

#### 9.3.1 Alga y reactivos

Se recolectaron muestras de *Silvetia compressa* (J. Agardh) (*Phaeophyceae* orden Fucales) en La Escalera, Baja California, México (31 ° 30 ' 59.1 " N 116 ° 38 ' 51.1 " W) de diciembre de 2014 hasta enero de 2015. El talo de algas marinas fue recolectado, lavado varias veces con agua de mar para eliminar arena y epífitas, escurrido sobre piedra limpia o tendedores y secado al sol dentro de una sombra de invernadero durante varios días hasta obtener un contenido de humedad del 10.9%. Posteriormente, las muestras se molieron (Pulvex modelo 200, Guadalajara, JAL, México), se pasaron a través de un tamiz de 500  $\mu\text{m}$  y se envasaron al vacío para su uso futuro.

#### 9.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico.

El diseño Box Behnken en combinación con SDR se utilizó para evaluar el efecto de los parámetros de extracción sobre el rendimiento de extracción de PT y PS y para optimizar las condiciones para obtener mayores rendimientos de PT y PS. El diseño experimental consistió en cuatro factores con tres niveles con un punto central (Tabla 1). Se monitorearon tres variables de respuesta: el rendimiento de extracción ( $Y_1$ , g extracto (EXT)  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$ ), rendimiento de extracción de PS ( $Y_2$ , g PS  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$ ) y rendimiento de extracción de PT ( $Y_3$ , mg EFG  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$ ).

**Tabla 1:** Variables independientes y los niveles seleccionados para el diseño Box- Behnken

Variable independiente	-1	0	1
Temperatura de extracción - $X_1$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	50	57.5	65
Densidad de poder - $X_2$ ( $\text{W cL}^{-1}$ )	1.2	2.4	3.8
Relación solvente/ alga - $X_3$ ( $\text{mL g as}^{-1}$ )	10.0	20.0	30.0
Concentración de etanol - $X_4$ (%)	25.0	62.5	100.0

Se realizaron veintisiete corridas aleatorias con dos repeticiones. Las variables independientes empleadas en este diseño fueron temperatura de extracción ( $X_1$ , 55 - 65 ° C), densidad de potencia de ultrasonido ( $X_2$ , 1.2 - 3.8  $\text{W cL}^{-1}$ ), relación solvente / alga ( $X_3$ , 10 - 30  $\text{mL g}_{\text{as}}^{-1}$ ) y concentración de etanol ( $X_4$ , 25 - 100%).

El rango de temperaturas y concentraciones de etanol utilizados se seleccionaron en base a la investigación documental realizada (Xi et al. 2009; Múzquiz et al. 2019). El rango de temperatura propuesto coincide con los rangos reportados para la extracción de florotaninos de plantas marinas, que generalmente están por debajo de 60 ° C (Tanniou et al. 2014; Puspita et al. 2017).

Las variables de respuesta se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden (Ecuación 1) donde, Y es la variable de respuesta a predecir (rendimientos de extracción de sólidos, PS y PT);  $\beta_0$  es el coeficiente constante del modelo;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$  son los coeficientes lineales;  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ , son los coeficientes cuadráticos y  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$  son los coeficientes de productos cruzados;  $X_1, X_2, X_3$  y  $X_4$  representan las variables independientes (temperatura de extracción, densidad de potencia, relación solvente / alga marina y concentración de etanol).

$$(1) Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2$$

El diseño BBD y el análisis de regresión lineal múltiple se realizaron utilizando el software JMP v.14. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de 0.05 para los datos experimentales, y se obtuvieron condiciones óptimas de extracción para las tres variables de respuesta utilizando la función de deseabilidad de la SDR.

### 9.3.3 Preparación del extracto

Para extraer los PT y PS del alga seca pulverizada, se resuspendieron muestras experimentales en el solvente de extracción con su correspondiente relación solvente / alga. Los extractos se colocaron en un baño de hielo y se ultrasonicaron (SFX150 Cell Disruptor, Branson, New Carlisle, IN, EE. UU.) durante 30 minutos con sus correspondientes intensidades ultrasónicas, utilizando una micropunta de 1/16" con una profundidad de inmersión de 10 cm. Después de la sonicación, todos los tratamientos de extracción se mezclaron a 250 rpm durante 90 minutos en una placa caliente agitada a su correspondiente temperatura de extracción. Después, los extractos se centrifugaron a 685 g durante 15 minutos a 4 ° C (SL16R Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.

UU.). El sobrenadante se transfirió a un evaporador centrífugo (evaporador Rocket Synergy, Ginebra, Ipswich, Reino Unido) para eliminar el etanol y el agua. Posteriormente, los extractos crudos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis (Xi et al. 2009; Múzquiz et al. 2019).

#### **9.3.4 Rendimiento de extracción de sólidos**

El rendimiento de extracción de sólidos ( $Y_1$ ) se determinó como la cantidad total de sólidos recuperados de las muestras de alga marina. Se expresó como g de extracto hidroetanólico g de alga seca<sup>-1</sup> ( $\text{g EXT g}_{\text{as}}^{-1}$ ).

#### **9.3.5 Contenido total de polisacáridos**

El contenido total de PS se determinó utilizando un método gravimétrico. El extracto concentrado se disolvió en 5 ml de metanol puro y se centrifugó durante 10 minutos a 2739 g. El sobrenadante de metanol se colectó para la cuantificación e identificación de PT, mientras que el precipitado se secó bajo un flujo de nitrógeno y se pesó. El rendimiento de extracción de PS ( $Y_2$ ) se determinó por la cantidad de sólidos recuperados después de la precipitación de metanol y se calculó como g de polisacárido g de alga seca<sup>-1</sup> ( $\text{g PS g}_{\text{as}}^{-1}$ ).

#### **9.3.6 Identificación y cuantificación de florotaninos en extractos de algas.**

La identificación de PT y la cuantificación del extracto de algas marinas seleccionado se realizó siguiendo la metodología descrita por Múzquiz et al. (Múzquiz et al. 2019) utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD, serie Agilent Technologies 1200, Santa Clara, CA, EE. UU.). El análisis de HPLC se realizó a través de una columna de fase reversa Luna C18 (250 mm, 4,6 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) con un caudal de 1  $\text{mL min}^{-1}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  y con un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . La fase móvil consistió en (A) agua acidificada (1% de ácido fórmico) y (B) 100% de metanol. La elución se realizó de la siguiente manera: 0-5 min 10% B, 5-30 min 20-60% B, 30-35 min 60% B, 35-40 min 60-20% B y 40-50 min 10% B (tiempo post corrida). Los datos espectrales de todos los picos se acumularon en el rango de 230-550 nm y los cromatogramas se registraron a 270 nm. Los datos cromatográficos se recopilaron utilizando el software HP-Agilent para cromatografía líquida (Copyright Agilent 184 Technologies, 1990–2003). Se utilizó floroglucinol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.

UU.) como estándar de cuantificación. El rendimiento de extracción de florotaninos ( $Y_3$ ) se expresó como mg de equivalentes de floroglucinol (EFG) por g de alga seca ( $\text{mg EFG g}_{\text{as}}^{-1}$ ) usando la Ecuación 2 como una curva de calibración ( $R^2 = 0.9994$ ), donde  $y$  es el área del pico y  $x$  es la concentración en  $\text{mg EFG g}_{\text{as}}^{-1}$ .

$$(2) \ y = 1.7075x + 0.9081$$

El modelo HPLC-MS-TOF G1969A Agilent 1100 (Santa Clara, CA, EE. UU.) fue ajustado a las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente y se usó para identificar compuestos bioactivos. Los espectros de masas se recogieron usando una fuente de electrospray en modo positivo (ESI +) en las siguientes condiciones: rango  $m/z$  150 a 1500, gas nitrógeno a  $300^\circ\text{C}$ , flujo de gas de secado  $8\text{ L min}^{-1}$ , presión del nebulizador 20 psi, voltaje capilar 4000 V, y voltaje de fragmento 70 V. Los cromatogramas de iones extraídos se obtuvieron usando el software Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.) considerando la masa precisa de cada compuesto bioactivo o sus aductos con Na o K con un rango de error de 0.01 unidades. Los espectros de masas se utilizaron para identificar los diferentes compuestos en función de sus patrones de fragmentación. Posteriormente, se compararon y verificaron en bases de datos de espectros de masas de compuestos naturales e informes anteriores de PT identificados en algas pardas.

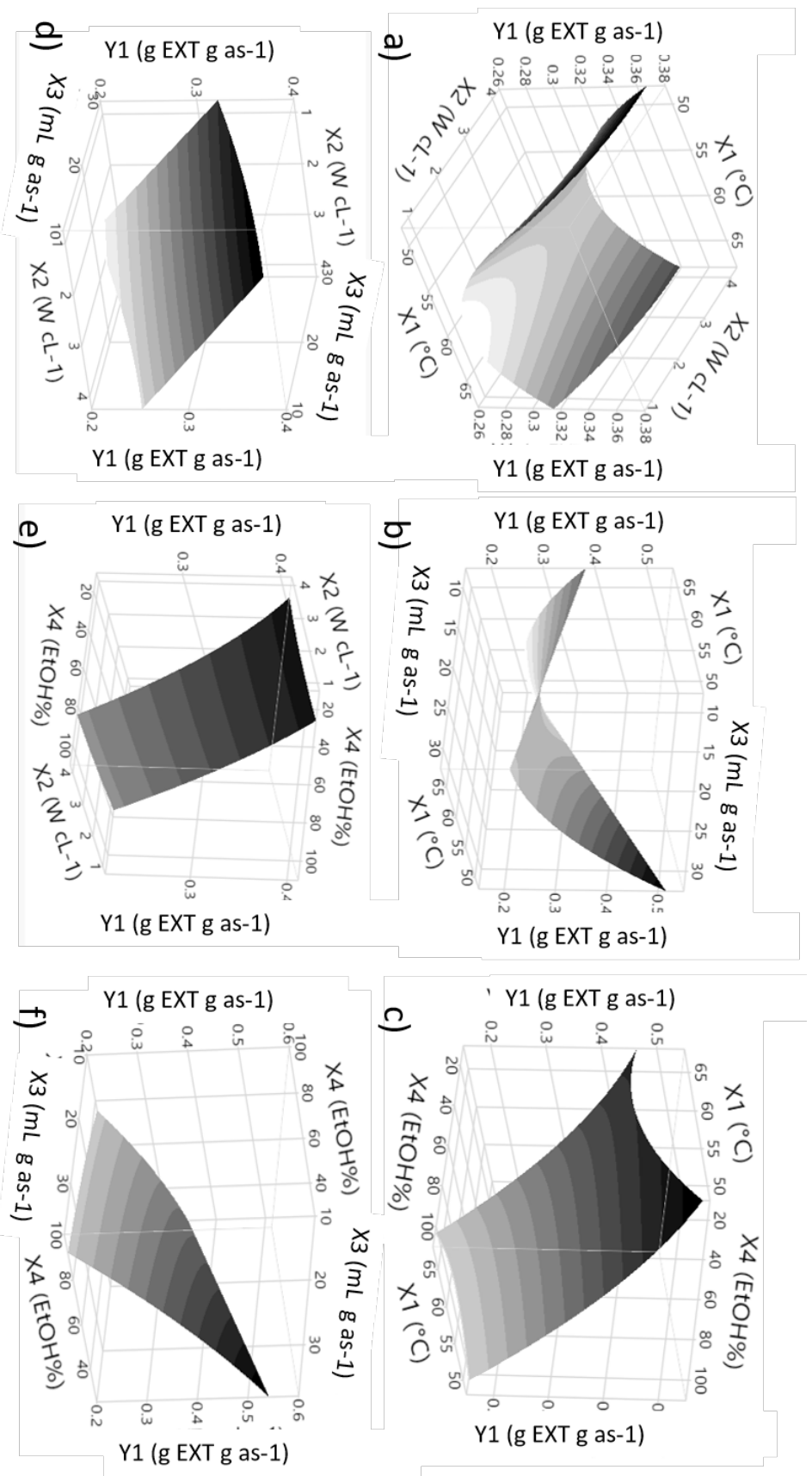
## 9.4 Resultados

### 9.4.1 Efecto de los parámetros de extracción en el rendimiento de extracción de sólidos.

Los resultados sobre el efecto de los parámetros de extracción en las veintisiete corridas aleatorias y sus respectivas réplicas se muestran en la Tabla 2. El efecto de la relación solvente / alga sobre el rendimiento de extracción se muestra en la Figura 1-b, 1-d y 1-f. El rendimiento de extracción varió de 0.1 a 0.60 g EXT  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$ . El mayor rendimiento de extracción de sólidos se obtuvo con los siguientes parámetros de extracción  $X_1$ : 50 ° C,  $X_2$ : 2.4 W  $\text{cL}^{-1}$ ,  $X_3$ : 30 mL  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$  y  $X_4$ : 62.5% EtOH. En contraste, el rendimiento de extracción más bajo se obtuvo cuando los parámetros de extracción fueron  $X_1$ : 57.5 ° C,  $X_2$ : 2.4 W  $\text{cL}^{-1}$ ,  $X_3$ : 30 mL  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$  y  $X_4$ : EtOH al 100%.

**Tabla 2:** Diseño Box-Behnken con la codificación de las variables independientes y sus resultados

Corrida	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (W cL <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> (mL g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> (%)	Y <sub>1</sub> (g EXT g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub> (g PS g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )	Y <sub>3</sub> (mg EFG g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )
1	57.5	2.4	20	62.5	0.35	0.1866	9.57
2	50	1.2	20	62.5	0.30	0.1667	3.31
3	57.5	2.4	30	25	0.48	0.1987	6.66
4	65	1.2	20	62.5	0.31	0.1740	7.05
5	57.5	2.4	30	100	0.11	0.0184	3.12
6	57.5	2.4	30	100	0.13	0.0166	2.97
7	57.5	2.4	10	25	0.36	0.2064	3.63
8	57.5	2.4	20	62.5	0.33	0.1874	9.04
9	50	3.8	20	62.5	0.33	0.1762	6.69
10	57.5	2.4	10	100	0.11	0.0472	1.74
11	50	3.8	20	62.5	0.34	0.1912	6.29
12	50	1.2	20	62.5	0.28	0.1666	4.27
13	57.5	2.4	10	25	0.35	0.2075	3.61
14	65	3.8	20	62.5	0.36	0.1648	6.97
15	65	1.2	20	62.5	0.31	0.1823	8.67
16	57.5	2.4	10	100	0.12	0.0326	1.70
17	57.5	2.4	30	25	0.45	0.2076	4.73
18	65	3.8	20	62.5	0.34	0.1745	9.83
19	50	2.4	20	25	0.49	0.2135	7.73
20	57.5	3.8	10	62.5	0.29	0.1685	10.93
21	57.5	1.2	10	62.5	0.27	0.1539	9.85
22	65	2.4	20	100	0.16	0.0477	7.50
23	65	2.4	20	25	0.50	0.2158	8.91
24	57.5	1.2	30	62.5	0.35	0.1798	5.77
25	50	2.4	20	100	0.15	0.0464	3.92
26	50	2.4	20	100	0.16	0.0452	3.37
27	65	2.4	20	100	0.14	0.0466	6.59
28	57.5	1.2	10	62.5	0.27	0.1464	7.89
29	57.5	3.8	10	62.5	0.28	0.1555	10.82
30	57.5	2.4	20	62.5	0.33	0.1770	8.34
31	50	2.4	20	25	0.52	0.2178	7.04
32	57.5	3.8	30	62.5	0.34	0.1915	7.72
33	57.5	1.2	30	62.5	0.32	0.1765	4.47
34	65	2.4	20	25	0.41	0.2014	8.31
35	57.5	3.8	30	62.5	0.37	0.1831	8.26
36	57.5	2.4	20	62.5	0.31	0.1678	7.52
37	65	2.4	10	62.5	0.31	0.1192	4.86
38	50	2.4	30	62.5	0.60	0.1918	5.24
39	57.5	3.8	20	100	0.21	0.0531	2.37
40	50	2.4	10	62.5	0.29	0.1800	6.51
41	65	2.4	30	62.5	0.35	0.1874	3.63
42	57.5	1.2	20	25	0.47	0.2444	3.93
43	57.5	2.4	20	62.5	0.28	0.1558	6.84
44	57.5	1.2	20	100	0.17	0.0653	2.50
45	65	2.4	10	62.5	0.35	0.1191	5.02
46	57.5	3.8	20	25	0.43	0.2513	5.47
47	65	2.4	30	62.5	0.37	0.1985	5.01
48	57.5	1.2	20	100	0.19	0.1098	2.76
49	57.5	2.4	20	62.5	0.33	0.2258	6.11
50	57.5	3.8	20	100	0.17	0.0499	2.62
51	50	2.4	30	62.5	0.53	0.2037	6.25
52	50	2.4	10	62.5	0.30	0.2005	5.77
53	57.5	3.8	20	25	0.47	0.2216	5.92
54	57.5	1.2	20	25	0.50	0.2266	4.02



**Figura 1: Superficies de respuesta en tres dimensiones del rendimiento de extracción (g EXT g<sup>as-1</sup>) del extracto de *S. compressa*. Muestra el efecto de interacción de la temperatura ( $X1$ , °C), la densidad de poder ( $X2$ , W cl<sup>-1</sup>), la relación solvente/alga ( $X3$ , mL g<sup>as-1</sup>) y la concentración de etanol ( $X4$ , %) sobre la variable de respuesta.**

La temperatura de extracción tuvo un efecto cuadrático significativo en el rendimiento de sólidos, disminuyendo en el rango de 50-57.5 ° C y aumentando en el rango de 57.5-65 ° C, con una ligera, pero significativa, tendencia lineal a disminuir el rendimiento y una interacción negativa significativa con la relación solvente / alga (Tabla 3).

**Tabla 3:** Coeficientes de regresión y coeficientes de determinación  $R^2$  de los modelos polinomiales obtenidos para las variables de respuesta para los extractos de *S. compressa*.

Termino	Y <sub>1</sub>		Y <sub>2</sub>		Y <sub>3</sub>	
	(g EXT g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )		(g PS g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )		(mg PT g <sub>as</sub> <sup>-1</sup> )	
	Coeficiente de regresión	P-Value	Coeficiente de regresión	P-Value	Coeficiente de regresión	P-Value
Intercepto	0.32**	< 0.0001	0.1834**	< 0.0001	7.90**	<0.0001
Lineal						
X <sub>1</sub>	-0.01*	0.0256	-0.0035 <sup>ns</sup>	0.4558	0.66*	0.0395
X <sub>2</sub>	0.00 <sup>ns</sup>	0.2399	-0.0004 <sup>ns</sup>	0.9228	0.80*	0.0130
X <sub>3</sub>	0.04**	< 0.0001	0.0139**	0.0056	-0.35 <sup>ns</sup>	0.2602
X <sub>4</sub>	-0.15**	< 0.0001	-0.0847**	< 0.0001	-1.20**	0.0004
Cuadrático						
X <sub>11</sub>	0.03**	0.0035	-0.0018 <sup>ns</sup>	0.7987	-0.33 <sup>ns</sup>	0.4820
X <sub>22</sub>	-0.00 <sup>ns</sup>	0.7868	0.0019 <sup>ns</sup>	0.7880	-0.34 <sup>ns</sup>	0.4601
X <sub>33</sub>	-0.00 <sup>ns</sup>	0.9834	-0.0106 <sup>ns</sup>	0.1440	-1.11*	0.0220
X <sub>44</sub>	-0.02**	0.0060	-0.0469**	< 0.0001	-2.68**	< 0.0001
Producto						
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0.00 <sup>ns</sup>	0.9139	-0.0063 <sup>ns</sup>	0.4413	-0.54 <sup>ns</sup>	0.3202
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0.06**	< 0.0001	0.0312**	0.0005	-0.05 <sup>ns</sup>	0.9171
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.00 <sup>ns</sup>	0.9139	-0.0006 <sup>ns</sup>	0.9349	0.21 <sup>ns</sup>	0.6892
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	0.01 <sup>ns</sup>	0.3335	0.0021 <sup>ns</sup>	0.7994	0.53 <sup>ns</sup>	0.3274
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.01 <sup>ns</sup>	0.3335	-0.0095 <sup>ns</sup>	0.2669	-0.46 <sup>ns</sup>	0.3930
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	-0.02*	0.0280	-0.0046 <sup>ns</sup>	0.5744	-0.18 <sup>ns</sup>	0.7287
Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0.9474		0.9167		0.7214	

\* Significativo p< 0.05; \*\* Altamente significativo p<0.01; <sup>ns</sup> No significativo



La densidad de potencia ( $X_2$ ) fue el único parámetro no significativo en el rendimiento de extracción de sólidos (Tabla 3). La temperatura de extracción ( $X_1$ ), la relación solvente / alga ( $X_3$ ) y la concentración de etanol ( $X_4$ ) fueron parámetros significativos ( $p < 0.05$ ). Solo la interacción entre  $X_1X_3$  y  $X_3X_4$  mostró un impacto significativo en las variables de respuesta. La ecuación (3) muestra el modelo polinomial de segundo orden que describe la respuesta de rendimiento de extracción de sólidos a los parámetros de extracción que tuvieron un efecto significativo:

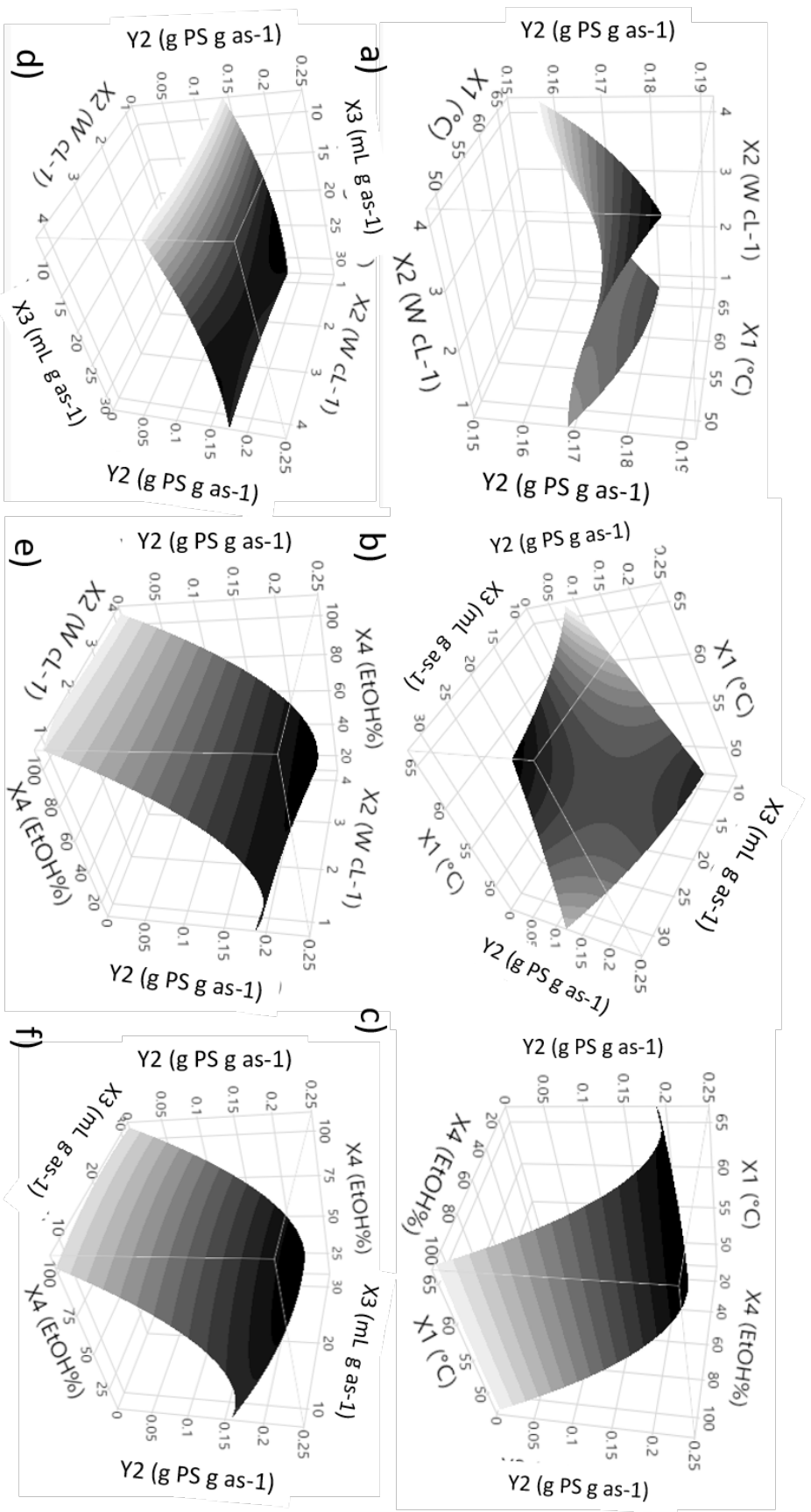
$$(3) Y_1 = 0.32 - 0.01X_1 + 0.04X_3 - 0.15X_4 - 0.06X_1X_3 - 0.02X_3X_4 + 0.03X_1^2 - 0.02X_4^2$$

#### 9.4.2 Efecto de los parámetros de extracción en el rendimiento de extracción de polisacáridos

El rendimiento de extracción de PS varió de 0.0166 a 0.2513 g de PS  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$  (Tabla 2). La concentración más alta de PS se obtuvo con los parámetros de extracción  $X_1$ : 57.5 ° C,  $X_2$ : 3.8 W  $\text{cL}^{-1}$ ,  $X_3$ : 20 mL  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$  y  $X_4$ : EtOH al 25%. La concentración más baja de PS se obtuvo cuando los parámetros de extracción fueron  $X_1$ : 57.5 ° C,  $X_2$ : 2.4 W  $\text{cL}^{-1}$ ,  $X_3$ : 30 mL  $\text{g}_{\text{as}}^{-1}$  y  $X_4$ : EtOH al 100%. La ecuación (4) muestra el modelo polinomial de segundo orden que describe el rendimiento de extracción de PS de *S. compressa* basado en los parámetros de extracción que mostraron efectos significativos:

$$(4) Y_2 = 0.1834 + 0.0139X_3 - 0.0847X_4 + 0.0312X_1X_3 - 0.0469X_4^2$$

La relación solvente / alga ( $X_3$ ) tuvo un efecto lineal positivo en la extracción de PS de *S. compressa* ( $p \leq 0.05$ ). La interacción entre los parámetros de extracción  $X_1$  (temperatura) y  $X_3$  fue positivamente significativa para la extracción de PS, contrastando con la interacción negativa entre  $X_1$  y  $X_3$  observada para el rendimiento total de sólidos (Tabla 3). La concentración de etanol ( $X_4$ ) tuvo efectos negativos significativos en el rendimiento de extracción de PS tanto a nivel lineal como cuadrático. A medida que aumentó la concentración de etanol, el rendimiento de extracción de PS en el extracto disminuyó, alcanzando un pico a altas concentraciones de etanol (Figura 2-c, 2-e y 2-f), que fue más pronunciado que para el rendimiento de extracción de sólidos (Figura 1-c, 1-e y 1-f).



**Figura 2:** Superficies de respuesta en tres dimensiones del rendimiento de extracción de polisacáridos (g PS g<sup>-1</sup>) de *S. compressa*: Muestra el efecto de interacción de la temperatura ( $X_1$ , °C), la densidad de poder ( $X_2$ , W mL<sup>-1</sup>), la relación solvente/alga ( $X_3$ , mL g<sup>-1</sup>) y la concentración de etanol ( $X_4$ , %) sobre la variable de respuesta.

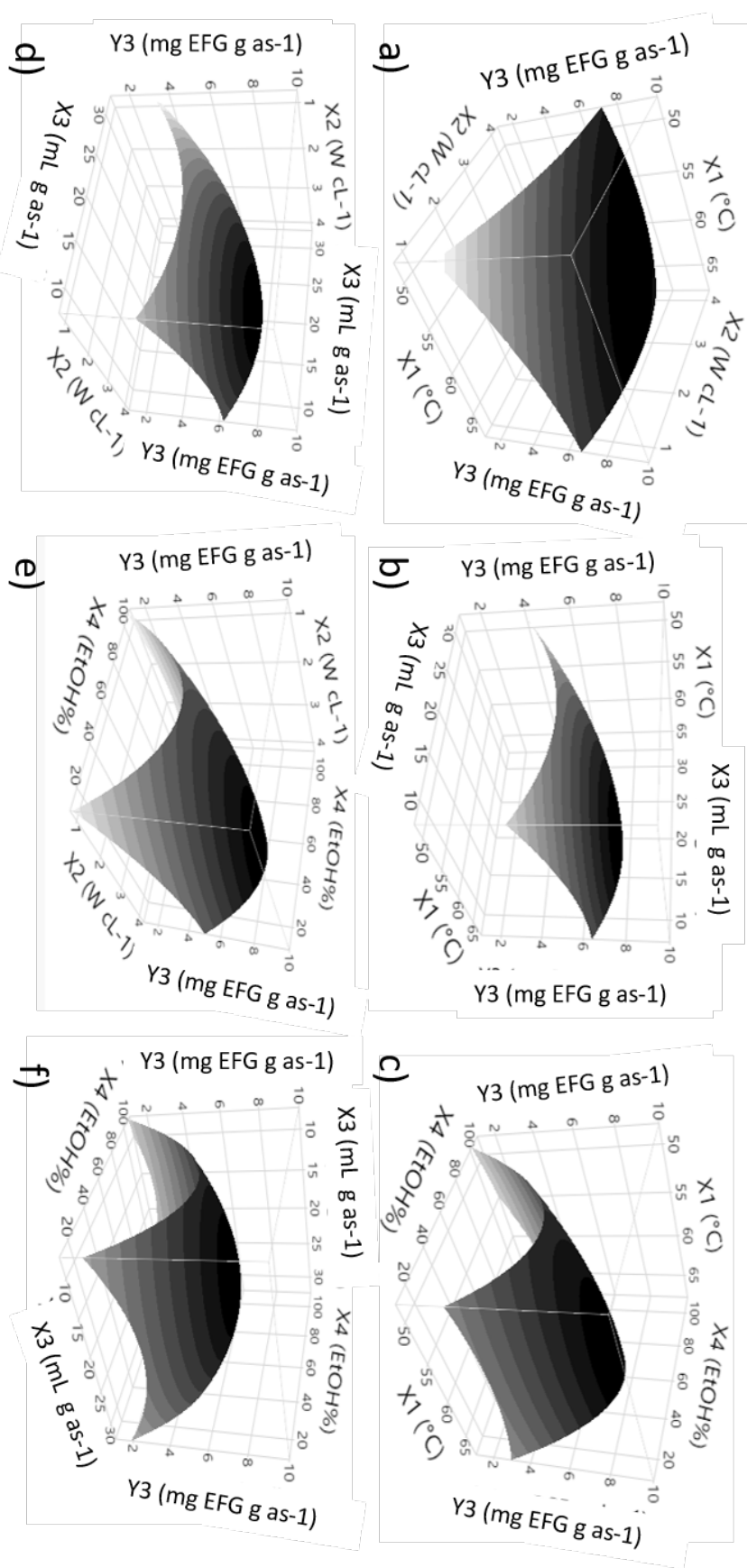
### 9.4.3 Efecto de los parámetros de extracción en el rendimiento de extracción de florotaninos

La concentración más alta de PT se obtuvo con los parámetros de extracción  $X_1$ : 57.5 ° C,  $X_2$ : 3.8 W cL<sup>-1</sup>,  $X_3$ : 10 mL g<sub>as</sub><sup>-1</sup> y  $X_4$ : 62.5% EtOH. La concentración de PT más baja se obtuvo cuando los parámetros de extracción fueron  $X_1$ : 57.5 ° C,  $X_2$ : 2.4 W cL<sup>-1</sup>,  $X_3$ : 10 mL g<sub>as</sub><sup>-1</sup> y  $X_4$ : EtOH al 100%. El rendimiento de extracción de florotaninos varió de 1.70 a 10.93 mg de EFG g<sub>as</sub><sup>-1</sup> (Tabla 2). Tres de los cuatro parámetros de extracción seleccionados tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de extracción de la harina de *S. compressa*; temperatura ( $p = 0.0395$ ), densidad de potencia ( $p = 0.0130$ ) y concentración de etanol ( $p = 0.004$ ) (Tabla 3). Solo dos términos cuadráticos fueron significativos para el rendimiento de extracción de PT: relación solvente / alga marina ( $X_3$ ) y la concentración de etanol ( $X_4$ ). Ninguna interacción entre los parámetros de extracción fue significativa para la extracción de PT.

La ecuación (5) muestra el modelo polinomial de segundo orden que describe el rendimiento de extracción de PT de *S. compressa* basado en los parámetros de extracción que presentaron efectos significativos:

$$(5) Y_3 = 7.90 + 0.66X_1 + 0.80X_2 - 1.20X_4 - 1.11X_3^2 - 2.68X_4^2$$

El aumento de temperatura favoreció la lixiviación de PT al disolvente de extracción, como se muestra en el MSR de la Figura 3-a, 3-by 3-c. Sin embargo, en el rango de densidad de potencia probado en este estudio, no hubo un efecto cuadrático significativo y solo un efecto lineal significativo, que se muestra claramente en las figuras 3-a (especialmente a bajas temperaturas) y 3-d.



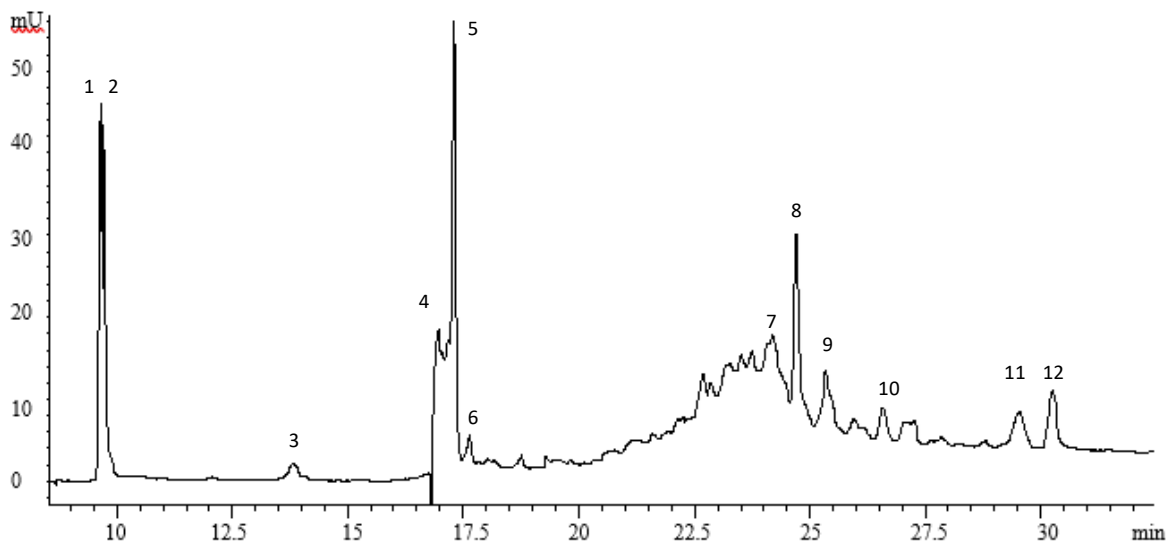
**Figura 3: Superficie de respuesta en 3D para el rendimiento de extracción de florotaninos (mg EFG g<sup>as-1</sup>) de *S. compressa*. Muestra el efecto interactivo de la temperatura (X<sub>1</sub>, °C), la densidad de poder (X<sub>2</sub>, W cL<sup>-1</sup>), la relación solvente/alga (X<sub>3</sub>, mL g<sup>as-1</sup>) y la concentración de etanol (X<sub>4</sub>, %)**

#### 9.4.4 Optimización de los parámetros de extracción y validación del modelo.

La Tabla 2 muestra las condiciones experimentales y los rendimientos EXT, PT y PS obtenidos para cada experimento. Utilizando los modelos estadísticos obtenidos, los valores óptimos para la extracción fueron  $X_1$ : 50 ° C,  $X_2$ : 3.8 W cL<sup>-1</sup>,  $X_3$ : 30 mL g<sub>as</sub><sup>-1</sup> y  $X_4$ : 32.33% EtOH. Los valores pronosticados para las variables de respuesta en estas condiciones de extracción fueron  $Y_1$ : 0.5596 g EXT g<sub>as</sub><sup>-1</sup>,  $Y_2$ : 0.2288 g PS g<sub>as</sub><sup>-1</sup> e  $Y_3$ : 7.4836 mg EFG g<sub>as</sub><sup>-1</sup>. Los rendimientos experimentales de extracción EXT, PS y PT fueron  $Y_1$ : 0.5572 ± 0.0220 g EXT g<sub>as</sub><sup>-1</sup>,  $Y_2$ : 0.2207 ± 0.030 g PS g<sub>as</sub><sup>-1</sup> y  $Y_3$ : 7.73 ± 0.2319 mg EFG g<sub>as</sub><sup>-1</sup> respectivamente, lo que sugiere que el modelo obtenido describe adecuadamente el proceso de extracción con EAU.

#### 9.4.5 Identificación de florotaninos presentes en los extractos.

El cromatograma mostró doce picos (Figura 4). De estos doce compuestos, diez pertenecen a la familia PT, uno pertenece a la familia de los ácidos fenólicos (ácido quínico), uno pertenece a la familia de los flavonoides (derivado de la acacetina) (Tabla 4). Entre los compuestos de PT identificados, cuatro pertenecían a la familia fuhalol (picos 1, 9, 11 y 12), cinco eran derivados de eckol (picos 3, 5, 6, 7 y 10) y uno era una subunidad de floroglucinol (pico 8).



**Figura 4:** Cromatograma del extracto del alga parda *S. compressa* registrado a 270 nm. Identificación de los picos: (1) dihidroxitetrafuhalol, (2) ácido quínico, (3) 7-phloroeckol, (4) derivado acacetina, (5) eckstonol, (6) dieckol, (7) eckol derivative, (8) 3 phloroglucinol units, (9) dihydroxypentafuhalol, (10) phlorofucofuroeckol A, (11) pentafuhalol, y (12) trifuhalol

**Tabla 4:** Florotaninos identificados en los extractos de *S. compressa* utilizando HPLC-DAD y HPLC-MS-TOF

Pico	Compuesto	Masa	[M+] (m/z)	UV max (λ max)	Ref
1	Dihidroxotetrafuhalol	-	546	227	(Montero et al. 2016; Agregán et al. 2017)
2	Ácido quínico	192.0633	192	312, 378	(Agregán et al. 2017)
3	7-Phloroeckol	-	496	275	(Cho et al. 2019)
4	Derivado acacetina	-	357	266	(Agregán et al. 2017)
5	Eckstonol	-	370	215, 267	(Iwai 2008)
6	Dieckol	742.0806	742	235	(Iwai 2008; Agregán et al. 2017)
7	Derivado eckol	-	545	297	(Agregán et al. 2017)
8	Tres unidades de Phloroglucinol	-	374	352	(Tierney et al. 2014; Vissers et al. 2017)
9	Dihidroxipentafuhalol	-	671	407	(Montero et al. 2016)
10	Phlorofucofuroeckol A	-	602	405	(Trifan et al. 2019)
11	Pentafuhalol	-	638	405	(Montero et al. 2016)
12	Trifuhalol	390.0587	390	367, 470	(Montero et al. 2016)

## 9.5 Discusión

La tendencia lineal negativa y el pronunciado efecto negativo de la temperatura en el rango inferior fueron contrarios a lo esperado, ya que los incrementos en la temperatura de extracción deberían haber producido un aumento en la solubilidad y la difusividad (Goula 2012). El mayor rendimiento de extracción de sólidos a temperaturas más altas se atribuyó a los tejidos suavizados de algas, con una integridad debilitada de la pared celular que favoreció la liberación de materia extraíble (Chew et al. 2011).

La relación solvente / alga marina ( $X_3$ ) afectó positivamente la cantidad total de materia extraíble que puede solubilizarse en el extracto antes de alcanzar su estado de saturación. La concentración de etanol ( $X_4$ ) afectó negativamente la difusión de los compuestos al solvente de extracción, aumentando este efecto negativo a altas concentraciones de etanol (tendencias lineales y cuadráticas altamente significativas). Esto se debió al cambio de polaridad del solvente. Un aumento en la relación solvente / algas típicamente aumenta la cantidad de solutos presentes en el extracto debido a una mayor tasa de lixiviación (Zhang et al. 2007). Esto puede atribuirse a que más materia extraíble puede permear desde la matriz celular hasta el solvente de extracción (Bucić-Kojić et al. 2007; Prasad et al. 2009).

El uso de bajas concentraciones de etanol dio como resultado los rendimientos de extracción más altos, lo que refleja la naturaleza hidrofílica de la mayoría de los componentes dentro del alga *S. compressa*. Las concentraciones de etanol por debajo del

50% permiten la extracción de polisacáridos y fracciones de proteínas presentes en la matriz de algas, mientras que las concentraciones de etanol entre 60 - 70% permiten la extracción de florotaninos (He et al. 2013).

Efectos similares de ambos parámetros (relación solvente / alga marina y concentración de etanol) sobre la cantidad de materia extraíble y el perfil químico bioactivo se han reportado para varias matrices de plantas como *Chelidonium majus L* (Grosso et al. 2014), flores de *Matricaria recutita L* (Zeković et al. 2014), bellotas (Onem et al. 2014) y algas pardas, como *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia caniculata* (Tierney et al. 2013) y *Macrocystis pyrifera* (Leyton et al. 2016). En términos generales, relaciones más altas de solvente / soluto y concentraciones más bajas de etanol en el solvente de extracción dieron como resultado rendimientos de extracción más elevados.

La naturaleza hidrofílica de los PS presentes en las algas marinas es la fuerza impulsora de la extracción, lo que resulta en la obtención de extractos ricos en PS al usar agua caliente o un solvente polar a baja concentración. El efecto de la concentración de etanol en la extracción de PS ha sido bien estudiado en varias matrices biológicas, como *Ganoderma lucidum* (Ma et al. 2013), así como en microalgas, como *Chlorella pyrenoidosa* (Shi et al. 2007) y algas pardas, como *Fucus vesiculosus* (Kadam et al. 2013), *Sargassum sp.* (Hahn et al. 2012), *Ecklonia radiata* (Charoensiddhi et al. 2017b), *Eisenia bicyclis* (Ermakova et al. 2013), *Laminaria saccharina* (Garcia-Vaquero et al. 2017), *Ascophyllum nodosum* (Foley et al. 2011), y *Sargassum glaucescens* (Huang et al. 2016a). La disminución en el rendimiento de los PS con el aumento en la concentración de etanol ocurre debido a la precipitación y la baja solubilidad de los PS en etanol. Cuando hay etanol presente, la constante dieléctrica del solvente de extracción disminuye y los ésteres de sulfato y iones positivos en los medios forman enlaces iónicos, lo que resulta en un precipitado rico en PS (Hahn et al. 2012; Ma et al. 2013). El uso de extracción enzimática alcalina reportó una gran mejora para los carbohidratos y los florotaninos, presentes en *Macrocystis pyrifera* maximizando hasta 22.1 y 0.5% su extracción en comparación con métodos más tradicionales (Leyton et al. 2017); sería interesante un análisis de costos comparando extracción con medios alcalinos o con el uso de enzimas contra la EAU.

El uso de altas temperaturas causa una disminución en la constante dieléctrica del agua, lo que resulta en un solvente más eficiente para la extracción de polifenoles (Prasad et al. 2009). Además, las temperaturas más altas aumentan el movimiento molecular del disolvente de extracción, lo que aumenta la permeabilidad y la extracción de los compuestos objetivo (He et al. 2013). Los aumentos en temperatura ( $X_1$ ) rompen la matriz fenólica, mejorando la extracción de polifenoles (Prasad et al. 2009). Otros autores han informado comportamientos similares en la extracción de PT de *Saccharina japonica* Aresh, *Ecklonia cava* y *Macrocystis pyrifera* (He et al. 2013; Leyton et al. 2016; Yoon et al. 2017).

Se ha demostrado que el efecto de la densidad de potencia muestra un comportamiento parabólico en el rendimiento de extracción de PT (Chemat et al. 2017). Las extracciones realizadas a altas intensidades ultrasónicas pueden disminuir las concentraciones de PT, lo cual puede estar relacionado con los radicales libres formados en el solvente de extracción por las prolongadas ondas de ultrasonido de alta amplitud (Luque de Castro y Priego-Capote 2007; Carrera et al. 2012). La degradación de los compuestos fenólicos relacionados con la formación de radicales libres debido a las altas intensidades ultrasónicas y los períodos prolongados de ultrasonido se han reportado en matrices como granada (Živković et al. 2018), cáscara de uva (Carrera et al. 2012), cáñamo (Teh y Birch 2014) y otras algas pardas (Han et al. 2011; Dang et al. 2017). Los polifenoles y los florotaninos actúan como agentes reductores y se oxidan por estos radicales libres (Tiwari et al. 2009; Carrera et al. 2012). Varios autores han informado un aumento en la extracción de PT en algas pardas mediante extracción asistida por ultrasonido. Las ondas ultrasónicas pueden reducir el tiempo de extracción, facilitar la liberación de PT de alto peso molecular y mejorar la extracción de PT hasta en un 30.5% en comparación con los experimentos control donde no se utilizó ultrasonido (Kadam et al. 2013; Lee et al. 2013; Kadam et al. 2015c; Kadam et al. 2015b; Obluchinskysya et al. 2015; Moreira et al. 2017). La mejora de la extracción de PT podría atribuirse a su liberación de las paredes celulares dañadas e incluso de las células debido a un efecto mecánico ultrasónico, que desencadena una liberación instantánea de los componentes del extracto de la planta en el medio circundante (Shirsath et al. 2012).



El tratamiento ultrasónico en las operaciones de extracción mejora la extracción de fitoquímicos de la matriz vegetal por medio de (1) la disrupción del tejido celular por cavitación, (2) y un aumento en la transferencia de masa de sólido a líquido por transmisión acústica (Panda y Manickam 2019). Mayores intensidades de ultrasonido o densidades de potencia aumentan el tamaño de las burbujas formadas en el solvente. El tamaño de las burbujas afecta tanto a la matriz celular como al solvente de extracción al promover implosiones más violentas capaces de reducir el tamaño de partículas y promover un flujo más turbulento dentro del solvente de extracción (generación a microescala de más difusión por remolinos y difusión interna). El aumento de la intensidad del ultrasonido o la densidad de potencia también afecta la temperatura del solvente de extracción, dependiendo de las propiedades de la molécula objetivo, puede mejorar la extracción o degradar el compuesto objetivo (Shirsath et al. 2012). El incremento en la densidad de potencia y en la intensidad del ultrasonido ha mejorado la extracción de compuestos fenólicos en el orégano debido a la transmisión acústica (Santos-Zea et al. 2018) y en las algas pardas *Ascophyllum nodosum* por efectos de cavitación (Kadam et al. 2015b).

Como miembros de la familia de los polifenoles, los PT tienen una naturaleza fisicoquímica polar y son altamente solubles en solventes polares como metanol, etanol y acetona (Tierney et al. 2013). La relación etanol / agua de la mezcla puede mejorar la extracción de PT por dos medios: (1) debido a la polaridad de la mezcla, se puede obtener un disolvente de extracción acuosa más alto debido a la ruptura de los enlaces de hidrógeno que liberan más compuestos fenólicos al medio y, (2) aumentando el área de contacto entre las algas y el solvente mediante hinchazón de partículas (Živković et al. 2018). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores donde el incremento de solvente polar en el solvente de extracción mejoró la extracción de PT y de polifenoles (He et al. 2013; Tierney et al. 2013; Sharmila et al. 2016). El etanol puro no mejora la extracción de PT, y se ha informado que las concentraciones elevadas de solventes (etanol, metanol y acetona) superiores al 60% pueden extraer componentes disueltos menos polares con mayor facilidad, lo que lleva a una reducción en la concentración de PT del extracto (He et al. 2013).

Los valores de rendimiento de extracción fueron 38.79% y 35.56% más altos que los reportados previamente por Muzquiz et al (Múzquiz et al. 2019) y Tapia-Salazar et al (Tapia-Salazar et al. 2019) para la extracción hidroetanólica de *S. compressa*. El rendimiento de extracción de PT en comparación con los informes anteriores fue menor. Los compuestos fenólicos totales (TPC) en *S. compressa* determinados por el método Folin-Ciocalteu (FC) (Múzquiz et al. 2019; Tapia-Salazar et al. 2019) presentaron concentraciones 11.6 y 16.9 veces más altas que la concentración total de PT obtenida en este estudio. Sin embargo, el rendimiento de PT obtenido en el presente estudio estuvo de acuerdo con el contenido de PT en algas pardas reportado por otros autores (Kadam et al. 2015a). Las diferencias en los resultados obtenidos pueden atribuirse a varios factores, principalmente al método de cuantificación y al estándar utilizado. La determinación de TPC por el método de FC no es un método selectivo y las discrepancias entre la determinación de FC y el método de HPLC se pueden atribuir a (1) un valor de TPC sobreestimado debido a la presencia de varios compuestos, como ácido ascórbico, azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácidos orgánicos y Fe (II) (Lester et al. 2012; Sánchez-Rangel et al. 2013), y (2) la detección de varios compuestos fenólicos diferentes de PT por el FC, por lo que su contribución al TPC no se detecta con el método HPLC (Porgali y Büyüktuncel 2012).

La familia fuhalol comprendió alrededor del 40% de los PT presentes en el extracto. Estos compuestos son unidades de floroglucinol unidas por enlaces éter y se han reportado en varios géneros de algas marinas, como *Bifurcaria*, *Sargassum*, *Carphophyllum*, *Laminaria*, *Ascophyllum* y *Pelvetia* (Pal Singh and Bharate 2006; Tierney et al. 2014; Li et al. 2017; Gonçalves-Fernández et al. 2019). Los derivados de Eckol representaron el 50% de los PT presentes en el extracto. Esta es una familia de PT compuesta por subunidades de floroglucinol unidas por enlaces dibenzo [1,4] dioxina, identificados principalmente en los géneros de algas pardas *Ecklonia* (*Eisenia*) (Pal Singh y Bharate 2006). Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que informan sobre las principales fuentes naturales de los PT, principalmente en algas pardas y algunas rojas (Pal Singh y Bharate 2006; Gonçalves-Fernández et al. 2019).

## 10.CAPITULO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIOTICO DEL EXTRACTO OPTIMIZADO Y SU FRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS.

### 10.1 Resumen

Pocos estudios han demostrado la interacción de los florotaninos y los polisacáridos de las algas en la diversidad microbiana y el crecimiento de bacterias probióticas en las primeras etapas de la fermentación colónica. El extracto hidroetanólico de *Silvetia compressa* rico en florotaninos y su fracción de polisacáridos aislados permitió la proliferación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y aumentó la síntesis total de ácidos grasos de cadena corta en comparación con un control negativo. Eckstolonol, dieckol y derivado de acetina en extracto hidroetanólico se agotaron después de ocho horas de fermentación colónica *in vitro*. Después de 48 h de fermentación, el extracto hidroetanólico mostró altos niveles de ácido acético ( $104,82 \mu\text{mol g}^{-1}$  heces húmedas) y propiónico ( $78,58 \mu\text{mol g}^{-1}$  heces húmedas), así como un aumento de *Bifidobacterium* ( $\log_{10} 6,77 \text{ UFC g}^{-1}$  heces húmedas) y *Lactobacillus* ( $\log_{10} 4,25 \text{ UFC g}^{-1}$  heces húmedas). Estos resultados no mostraron diferencias significativas con la inulina ( $p > 0,05$ ), lo que sugiere el potencial del extracto hidroetanólico de *Silvetia compressa* para mejorar la microbiota intestinal humana.

### 10.2 Introducción

La interacción entre los compuestos fenólicos y la microbiota intestinal humana (MIH) ha ganado interés científico debido a la amplia gama de funciones fisiológicas en las que intervienen ambos, incluyendo actividades metabólicas y enzimáticas que apoyan la salud digestiva del hospedero (Espín et al. 2017). La MIH protege al huésped contra patógenos gastrointestinales (Vogt et al. 2015), ayuda en el procesamiento de nutrientes (van Eunen et al. 2013) y modula la respuesta inmune del intestino (Fernández et al. 2016). Los trastornos en las poblaciones de la MIH también se han relacionado con diversas enfermedades crónicas graves, como la diabetes tipo 2, la obesidad y el cáncer de colon (Fu et al. 2018).

Los estudios de la MIH han dado lugar al concepto de prebióticos. Estos se definen como componentes alimentarios no digeribles que son fermentados preferentemente por miembros la MIH y estimulan selectivamente el crecimiento y / o la actividad de los microorganismos intestinales que generan beneficios para la salud del huésped (Charoensiddhi et al. 2017b; Okolie et al. 2019). El desarrollo de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se considera un signo de prebiosis (Kleerebezem and Vaughan 2009; Charoensiddhi et al. 2017a). La amplia gama de enfermedades gastrointestinales ha propiciado el desarrollo de un mercado de prebióticos, con un valor estimado de 3,400 millones de dólares para el año 2018 y se espera que alcance los 8,340 millones para 2026 (Reports and Data 2019). Por lo tanto, la investigación centrada en el desarrollo de prebióticos eficaces puede tener un gran impacto científico y económico.

El género *Silvetia* pertenece a la familia Fucaceae (Fucales, Phaeophyceae); se utiliza como ingrediente alimentario en países asiáticos (Pereira 2016), así como para biorremediación (Girardi et al. 2014). *Silvetia compressa* (J. Agardh; E. Serrão, TO Cho, SM Boo & Brawley), anteriormente conocida como *Pelvetia fastigiata* (J. Agardh; De Toni), es un miembro común de la comunidad fucoide intermareal superior en la costa del Pacífico de Norte América desde el condado de Humboldt, California hasta Punta Baja, Baja California, México, incluidas las islas costeras (Silva et al. 2004; Pedroche et al. 2008). *Silvetia compressa* tiene aplicaciones industriales potenciales como fertilizante, forraje y materia prima para la extracción de alginato y otros coloides utilizados como espesantes en la industria alimentaria (Aguilar-Rosas et al. 2002). Dado que los florotaninos y los polisacáridos tienen potenciales beneficios para la salud, las condiciones para recuperar ambas familias de compuestos de *S. compressa* se optimizaron previamente mediante extracción asistida por ultrasonido (Vázquez-Rodríguez et al. 2020). Se ha encontrado que estos extractos hidroetanólicos ricos en florotaninos (PT) y polisacáridos (PS) presentan una gran variedad de actividades que promueven la salud, tales como hipocolesterolemia en ratas Wistar (Acevedo-Pacheco et al. 2020), antiviral (Morán-Santibañez et al., 2016), antioxidante, así como actividades inhibitoras de la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa (Múzquiz et al., 2019). Esta alga es rica en fucoidan (11-12,1%), polisacáridos sulfatados (15-16%) (Hernández-Garibay et al. 2019), fibra dietética soluble (9,1%), fibra dietética insoluble (50,1%), fenólicos totales (28%) y PT

(0,73%) (Múzquiz et al. 2019; Tapia-Salazar et al. 2019; Vázquez-Rodríguez et al. 2020). El contenido de fibra dietética y fenólicos en los extractos de *S. compressa* es una característica importante para desarrollar nuevos alimentos funcionales.

Se sabe que las algas pardas son una rica fuente de fibra con la presencia de varios polisacáridos no digeribles, incluidos laminarina, fucoïdan y alginato. Se ha demostrado previamente que estos polisacáridos individuales alteran favorablemente la composición y la actividad de la MIH (Strain et al. 2020). Las algas pardas también son una fuente rica de PT y PS que mejoran selectivamente la actividad de las bacterias benéficas y estimulan la producción de metabolitos funcionales como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que tienen una influencia positiva en la salud del huésped (Charoensiddhi et al. 2016; Zheng et al. 2020). Los extractos de algas que contienen PT o PS, separados o mezclados, presentan actividades hipoglucémicas, hipolipidémicas, anticancerosas, antivirales, antibacterianas y antioxidantes (Rodrigues et al. 2015; Charoensiddhi et al. 2017b; Garcia-Vaquero et al. 2017; Praveen et al. 2019).

Existen estudios previos sobre la actividad prebiótica de diversas algas rojas y pardas y sus respectivos extractos. En su experimento de fermentación *in vitro*, Ramnani et al. (2012) demostraron que los PS de bajo peso molecular derivados de polvos de agar o alginato de *Gracilaria spp.*, *Gelidium sesquipedale* y *Ascophyllum nodosum* son capaces de promover la síntesis de AGCC, y además ejercen cambios en la MIH después de 24h de fermentación. Los cambios en la MIH determinados con hibridación fluorescente *in-situ* reflejaron un aumento significativo en el número de células del género probiótico *Bifidobacterium* (incrementado de  $8.06 \pm 0.22$  a  $8.55 \pm 0.11 \log_{10}$  células  $\text{ml}^{-1}$ ). Por otra parte, la digestión y fermentación *in vitro* de un extracto crudo rico en PS (principalmente fucoïdan) de *Laminaria japonica* permitió mediante conteos bacterianos determinar la proliferación significativa de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (8.27 a 9.01 y 7.48 a 8.52  $\log_{10}$ UFC  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente); además de la síntesis de ácido láctico y ACGG como ácido butírico, ácido acético (Kong et al. 2016). Fu et al. (2018) analizaron mediante secuenciación del gen 16s los cambios en las poblaciones de bacterias ejercidos por la fermentación *in vitro* de 48h de un nuevo PS obtenido del alga *Sargassum thunbergii*; estos cambios a nivel phylum resultaron en una proliferación de los phyla

Bacteroidetes y Actinobacteria; a nivel genero después de 24 y 48h de fermentación se incrementaron las abundancias relativas de géneros productores de ácido acético (bifidobacterium) y ácido butírico (*Faecalibacterium*, *Roseburia* y *Ruminococcus*) (Fu et al. 2018). Otros experimentos reportados con algas pardas incluyen un extracto rico en PS de *Laminaria digitata* (Strain et al. 2020), extractos enriquecidos en PS y PT de *Ecklonia radiata* (Charoensiddhi et al. 2016; Charoensiddhi et al. 2017b) y extractos ricos en PT y fucoidan de *Ascophylum nodosum* (Corona et al. 2016; Okolie et al. 2019). No obstante, los efectos prebióticos de los extractos de *S. compressa*, y en particular las variaciones inducidas en las poblaciones bacterianas fermentadoras de la MIH, así como los productos de fermentación, incluidos los AGCC, no se han explorado en profundidad. Asimismo, los estudios previos sobre la MIH se han centrado principalmente en extractos de algas pardas ricos en PS, pero Charoensiddhi, et al. (2017) demostraron que los PT de *Ecklonia radiata* afectan la diversidad microbiana y el crecimiento de bacterias probióticas en las primeras etapas de la fermentación colónica. Por lo tanto, los PT y los PS contenidos en el extracto hidroetanólico deben evaluarse antes de proponer un ingrediente funcional de algas pardas.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto prebiótico en etapas de un extracto hidroetanólico (EXT) y su fracción PS, ambos extraídos del alga parda *S. compressa*, utilizando una metodología *in vitro* que simula el paso de los alimentos a través del tracto digestivo y su posterior fermentación colónica. La evaluación del efecto prebiótico se dio mediante el seguimiento de: (a) los cambios en la MIH y el desarrollo de bacterias probióticas específicas, (b) la síntesis de AGCC y (c) los cambios en la concentración de PT y carbohidratos presentes durante la fermentación del EXT y su fracción PS.

### **10.3 Materiales y Métodos**

#### **10.3.1 Alga y reactivos**

Se recolectaron muestras de algas *Silvetia compressa* desde diciembre del 2014 hasta enero de 2015 en La Escalera Baja California Sur, México. Después de la recolección, el talo de algas se enjuagó con agua de mar para eliminar arena y epífitas, se escurrió sobre piedra limpia o tendedores y se secó al sol dentro de invernadero durante varios días hasta alcanzar un contenido de humedad del 10%. Finalmente, las muestras se trituraron

(modelo 200, Pulvex), se tamizaron con un tamiz de 500  $\mu\text{m}$  y se empacaron al vacío hasta su uso.

### **10.3.2 Extracción y preparación de la fracción de polisacáridos**

La extracción de PT y PS de muestras de harina de *S. compressa* se realizó mediante extracción asistida por ultrasonido como detallan Vázquez-Rodríguez et al. (2020). Se suspendieron alícuotas experimentales en etanol acuoso al 32,33% usando una relación solvente / alga de 30 ml  $\text{g}^{-1}$  de alga seca. Las suspensiones de alícuotas se colocaron en un baño con hielo y se sonicaron (SFX150 Cell Disruptor, Branson, New Carlisle, IN, EE. UU.) durante 30 minutos a una densidad de potencia de 3.8 W  $\text{cL}^{-1}$ , utilizando una micro punta de 1/16" con una profundidad de inmersión de 10 cm. Luego se mezcló a 250 rpm y 50 ° C durante 90 min en una plancha de calentamiento con agitación. Posteriormente, las suspensiones se centrifugaron a 685 g durante 15 min a 4 ° C (SL16R Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) y el sobrenadante se transfirió a un evaporador (evaporador Rocket Synergy, Genevac, Ipswich, Reino Unido) para eliminar el etanol y el agua. Finalmente, los extractos brutos se almacenaron a -80 ° C hasta su posterior análisis. La fracción de polisacáridos (PS) se obtuvo disolviendo el extracto concentrado (EXT) en metanol puro en una relación 1:10 (p / v) y centrifugando durante 10 min a 2739 x g. Los PT solubles en metanol se recuperaron y el material no disuelto (PS) se secó bajo un flujo de nitrógeno y luego se pesó y almacenó a -80°C hasta su análisis posterior.

### **10.3.3 Digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro***

La digestión gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo según Mosele et al. (2015) utilizando el extracto hidroetanólico (EXT), su fracción de polisacárido (PS), inulina (INU) como control positivo y un control negativo (CTRL) sin ningún sustrato agregado. Todo el proceso se llevó a cabo a 37 ° C con agitación continua. Se suspendieron 1.5 gramos de cada sustrato en 100 mL de saliva artificial, con agitación a 200 rpm en una incubadora con agitación (tampón fosfato 5 mM, pH 6,9 con NaCl al 0.04% y  $\text{CaCl}_2$  al 0.044%), y se incubaron durante 5 min. Después del tratamiento con  $\alpha$ -amilasa (10 mg  $\text{g}^{-1}$  sustrato) (Sigma-Aldrich, EE. UU), el pH se ajustó a 2.0 usando HCl y se incubó durante 60 min a 200 rpm en presencia de pepsina (15 mg  $\text{g}^{-1}$  de sustrato) (Sigma-Aldrich, EE. UU) para simular la digestión gástrica. Luego de la etapa de digestión gástrica, se ajustó el pH a 6.5 con  $\text{NaHCO}_3$  (0.5 N), y se realizó una digestión final agregando pancreatina (20 mg  $\text{g}^{-1}$

de sustrato) (Sigma-Aldrich, EE. UU) y sales biliares (133.33 mg g<sup>-1</sup> de sustrato) (Sigma-Aldrich, EE. UU). La mezcla resultante se dializó durante 2 horas en oscuridad utilizando una membrana de diálisis sumergida en 100 mL de tampón fosfato (pH 7.5) a 200 rpm de agitación. Durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, la temperatura se mantuvo a 37 ° C utilizando un circuito cerrado de agua destilada que rodea el sistema. Después de la digestión duodenal dinámica, se recogieron dos fracciones de la membrana de diálisis: La fracción "INTERNA" y "EXTERNA". La fracción "INTERNA" describe el material digerido que llega al colon, mientras que la fracción "EXTERNA" consistió en la solución tampón de fosfatos que contiene los compuestos capaces de atravesar la membrana utilizada. Esta se consideró la fracción biodisponible de la muestra (compuestos que serían absorbidos en el intestino delgado).

La fracción "INTERNA" se incubó *in vitro* en presencia de MIH. La MIH se obtuvo haciendo un pool de heces humanas que se recolectaron de diez voluntarios sanos. Los criterios de selección requerían que los voluntarios tuvieran entre 25 y 35 años y que no hubieran tomado antibióticos en los últimos 3 meses. Las muestras de heces se agruparon y almacenaron hasta por dos horas a 4 ° C en condiciones anaeróbicas. Se preparó un medio (10% de heces) mezclando heces con una solución tampón de carbonato-fosfato pre-reducido preparado de acuerdo con Mosele et al. (2015). El pH del medio de carbonato se ajustó a 6.5 usando HCl. Luego, se preparó una dilución 1:10 (p / v) de las muestras fecales con la solución tampón y se homogeneizó utilizando un stomacher (1 min). Se tomaron alícuotas de un mililitro de inóculo fecal (10% de heces) en tubos de 15 mL y se mezclaron con 9 mL de fracción "INTERNA" y se incubaron durante diferentes períodos de tiempo (0, 2, 8, 24 y 48 h). Estas muestras se prepararon en paralelo con dos controles: uno con inóculo fecal sin el contenido del tubo de diálisis y otro que fue un tampón carbonato-fosfato con la fracción de contenido del tubo de diálisis sin inóculo fecal. Se llevaron a cabo dos réplicas de cada incubación en condiciones anaeróbicas a 37 ° C en ausencia de luz sin agitación. Las muestras obtenidas de cada tiempo de digestión se almacenaron a -80 ° C hasta su posterior análisis.

#### **10.3.4 Extracción de ADN y secuenciación de Illumina**

Se extrajo ADN genómico bacteriano de cada réplica de las muestras fermentadas. La extracción de ADN genómico de las fermentaciones del microbiota fecal se llevó a cabo



siguiendo el manual del kit QIAamp DNA Kit Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) con las instrucciones del fabricante. El ADN bacteriano se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 v3.5.2 (Nanodrop Technology, Cambridge, Reino Unido); las muestras se almacenaron a -20 ° C.

El análisis de la diversidad de la microbiota basado en la región V3 y V4 se llevó a cabo en una sola réplica por experimento de fermentación utilizando KAPA HiFi HotStart Ready (Kapa Biosystems, EE. UU.) Para la amplificación por PCR los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron empleando un amplicón cebador “forward” 16S = 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG y un amplicón cebador “reverse” de 16S = 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Las pruebas de PCR se llevaron a cabo en una máquina de PCR G-storm en las siguientes condiciones: 95 ° C durante 3 min seguido de 25 ciclos a 95 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 30 s seguidos de 5 min a 72 ° C, después de lo cual las muestras se mantuvieron a 4 ° C. Las soluciones de PCR tenían un volumen final de 25 µL y consistían en 12,5 µL de mezcla preparada KAPA HiFi HotStart, 5 µL de cebador “forward” Amplicon PCR (1 µM), 5 µL de cebador “reverse” Amplicon PCR y 2,5 µL de ADN microbiano (5 ng µL<sup>-1</sup>). El producto de PCR de cada muestra se limpió utilizando el kit Agent-court AMPure XP (Beckman Coulter Genomics, Reino Unido) según el protocolo del fabricante. Los productos de PCR limpios se eluyeron en 50 µl y la PCR de índice de muestra se llevó a cabo utilizando un kit de índice Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se desnaturalizaron y agruparon antes de agregar PhiX de acuerdo con el protocolo del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo utilizando un sistema MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Las lecturas por muestra, la longitud de las secuencias y la calidad de las lecturas fueron analizadas por el software QIIME versión 2. El número mínimo de lecturas fue 33164 y el máximo 687215. La longitud de las secuencias fue 301 para “forward” (FW) y 300 para reverse (RV). Las secuencias se desreplicaron, permitiendo al menos diez errores por secuencia. Las quimeras se filtraron y las secuencias restantes se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs). Posteriormente, se asignó la taxonomía utilizando la base de datos de

Greengenes (versión 13\_8), mientras que las diversidades alfa (índices de Chao1, Simpson y Shannon) y beta se calcularon utilizando PAST 4.0.

### 10.3.5 Recuento de poblaciones microbianas mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR)

Se utilizaron cebadores específicos para bacterias totales, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, para cuantificar la microbiota fecal mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCR) en tiempo real de acuerdo con literatura previa (Walter et al. 2001; Matsuki et al. 2002). Las secuencias del cebador fueron las siguientes: bacterias totales “Forward”: 5'TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC-3' y “Reverse”: 5'-CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'; *Bifidobacterium* “Forward”: 5'-CTCCTGGAAACGGGTGG-3' y “Reverse”: 5'-GGTGTTCCTCCCGATATCTACA-3'; Género *Lactobacillus* “Forward”: 5'-GGAAACAGRTGCTAATACCG-3' y “Reverse”: 5'-CACCGCTACACATGGAG-3'. Cada reacción de PCR contenía 15 ng de ADN fecal y 2 µL de cada cebador a una concentración de 5 pmol µL<sup>-1</sup> y la amplificación se realizó con el kit iQ SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.), en un termociclador de PCR en tiempo real iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.). Para la cuantificación de las bacterias totales y del género *Lactobacillus*, la reacción se incubó a 95 ° C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 10 s a 95 ° C, 30 s a 61 ° C y 20 s a 72 ° C. Para la cuantificación del grupo *Bifidobacterium*, la reacción se incubó a 95 ° C durante 10 min, seguido de 35 ciclos de 10 s a 95 ° C, 30 s a 55 ° C y 20 s a 72 ° C. Los productos fluorescentes se detectaron en el último paso de cada ciclo. Los valores de Ct y el análisis de la curva de fusión después de la amplificación se utilizaron para calcular la población bacteriana y distinguir los productos de PCR diana de los no diana. Se construyeron curvas estándar a partir de ocho diluciones diferentes en un orden de magnitud de 10. La población bacteriana se expresó como el valor logarítmico de la unidad formadora de colonias (log<sub>10</sub>UFC) g<sup>-1</sup> de heces húmedas utilizando la ecuación (1) para bacterias totales, (2) para *Bifidobacterium* y (3) para *Lactobacillus*. Donde y es el Ct y x la concentración bacteriana expresada en log<sub>10</sub> UFC por g<sup>-1</sup> de heces húmedas.

$$y = -3.103x + 28.927 \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$y = -3.346x + 33.413 \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$y = -3.428x + 32.056 \quad \text{Ecuación (3)}$$

### 10.3.6 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

Se tomaron muestras de las fermentaciones a las 0, 2, 8, 24 y 48 h para el análisis de AGCC y se almacenaron inmediatamente a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de su cuantificación. Para el análisis de GC-FID, las muestras se centrifugaron durante 10 min a  $10.000\text{ g}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se colectó el sobrenadante y se colocó en un vial de 2.5 ml. El análisis se realizó en condiciones estándar de laboratorio, de  $20$  a  $21^{\circ}\text{C}$ , utilizando un cromatógrafo de gases (6850 Network GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama y una columna Agilent HP-FFAP (25 - mm de longitud x 0,32 mm de diámetro interno x 0,50  $\mu\text{m}$  de espesor de película). El gas portador fue helio con un flujo total de  $8.7\text{ ml min}^{-1}$  y una presión de 6.1 psi. El programa de temperatura comenzó a  $120^{\circ}\text{C}$  y se elevó a  $240^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Las muestras de prueba se inyectaron (1  $\mu\text{L}$ ) en modo splitless. Con base a los datos adquiridos, incluidas las curvas estándar, el contenido de AGCC se expresó en micromoles de AGCC por gramo de materia fecal húmeda ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  de heces húmedas).

### 10.3.7 Identificación y cuantificación de florotaninos

La cuantificación de florotaninos en las muestras de fermentación del EXT se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada con un detector de red de diodos (HPLC-DAD, Agilent Technologies 1200 series, EE. UU.). La separación se realizó a través de una columna de fase reversa Luna C18 (250 mm, 4.6 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, EE. UU.) Con un flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$  a  $30^{\circ}\text{C}$  y un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . La fase móvil consistió en (A) agua acidificada (ácido fórmico al 1%) y (B) metanol al 100%. La elución se realizó de la siguiente manera: 0–5 min 10% B, 5–30 min 20–60% B, 30–35 min 60% B, 35–40 min 60–20% B y 40–50 min 10% B (post time). Los datos espectrales de todos los picos se acumularon en el rango de 230 a 550 nm y los cromatogramas se registraron a 270 nm. Los datos cromatográficos se recopilieron utilizando el software HP-Agilent para LC y se utilizó floroglucinol (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como estándar de cuantificación. La concentración de florotaninos se expresó como mg de equivalentes de floroglucinol (PGE) por g de heces húmedas ( $\text{mg PGE g}^{-1}$  de heces húmedas) utilizando la ecuación  $y = 1.7075x + 0.9081$  ( $R^2 = 0.9994$ ) como curva de calibración, donde y es el área del pico y x es la concentración en mg PGE  $\text{g}^{-1}$  de heces húmedas.

Para identificar compuestos potencialmente bioactivos mediante espectrometría de masas se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente utilizando un modelo G1969A Agilent 1100 de HPLC-MS-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los espectros de masas se recogieron utilizando una fuente de electropulverización en modo positivo (ESI +) en las siguientes condiciones: rango  $m/z$  150 a 1500, gas nitrógeno, temperatura del gas 300 ° C, flujo de gas de secado 8 L min<sup>-1</sup>, presión del nebulizador 20 psi, voltaje capilar 4000 V y voltaje de fragmento 70 V. Los cromatogramas de iones extraídos se obtuvieron usando el software Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se utilizaron masas precisas y aductos con Na o K con un rango de error de 0.01 unidades para identificar los diferentes compuestos en base a literatura previa.

#### **10.3.8 Cuantificación de carbohidratos**

La cuantificación de carbohidratos se realizó con el método modificado reportado por Heredia-Olea et al. (2015). Se realizó con una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, modelo Waters HPLC Breeze, Milford, MA, EE. UU.) equipada con bombas isocráticas (Waters 1515), un desgasificador de fase móvil (AF Waters), un muestreador automático (Waters 717 plus), un detector de índice de refracción (Waters 2414) y el software Empower 2 para procesar datos y controlar el equipo. Se utilizó una columna Shodex SP0810 y un desalinizador catiónico / aniónico (Biorad). La temperatura de la columna se fijó en 85 ° C, mientras que el detector y el inyector automático en 50 y 4 ° C, respectivamente. Se utilizaron estándares de D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-galactosa, D-fucosa, ácido glucurónico y manitol (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EE.UU.). El tiempo de ejecución fue de 40 min. Los carbohidratos se expresaron como  $\mu$ mol de carbohidratos por gramo de heces húmedas.

#### **10.3.9 Análisis estadístico**

El análisis de diversidad beta se realizó utilizando los análisis de coordenadas principales (PCoA) y distancia de Bray-Curtis. Estos análisis se utilizaron para cuantificar las diferencias de composición entre las comunidades microbianas utilizando los softwares PAST 4.0 y PRIMER 7.

Se utilizó un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey-Kramer para determinar la importancia de los sustratos en cada tiempo de fermentación sobre el desarrollo

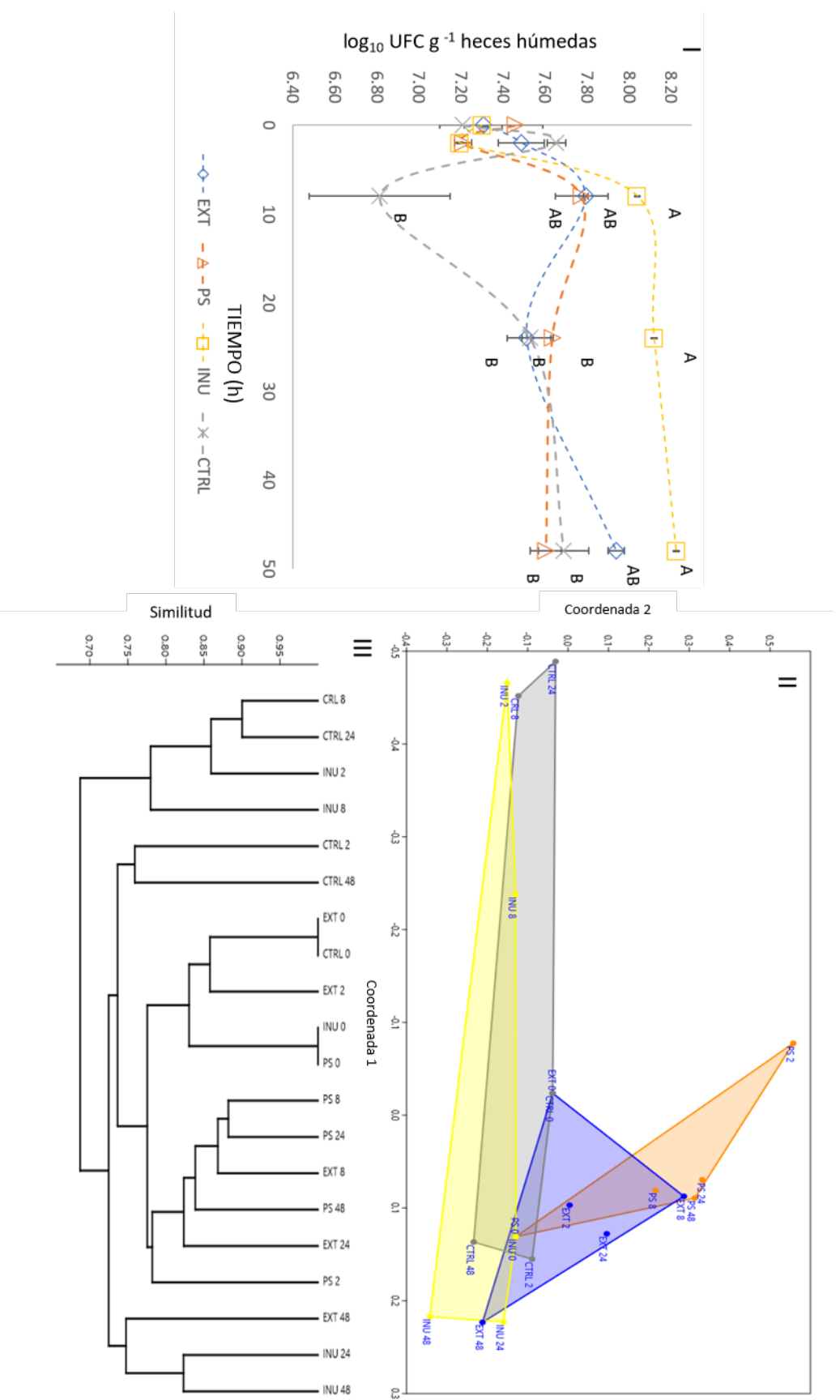
bacteriano, la producción de AGCC, la concentración de florotaninos y la concentración de carbohidratos ( $p < 0.05$ ). Para evaluar la correlación dentro de las variables de respuesta, se realizó una prueba de Pearson ( $p \leq 0.05$ ). Todos los análisis y pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software JMP 14.

## **10.4 Resultados**

### **10.4.1 Cambios en las bacterias totales y la diversidad beta de las comunidades bacterianas de la microbiota intestinal humana**

El recuento total de bacterias aumentó significativamente después de 8 h de fermentación de las muestras con algas (EXT y PS) y con INU en comparación con el control negativo (Figura 5-I). INU presentó el recuento total bacteriano más alto después de 24 h. A las 48 h no hubo diferencia significativa entre el INU y el EXT ( $p > 0.05$ ).

La diversidad beta y el efecto de cada sustrato y tiempo de fermentación sobre la composición de la comunidad bacteriana se examinó mediante PCoA y análisis de grupos (Figura 5-II y Figura 5-III). INU y CTRL generaron los cambios más contrastantes en la MIH, mientras que EXT y PS estuvieron más cerca de la diversidad bacteriana inicial de muestras humanas sanas. Con base en la distancia de Bray-Curtis, todos los tiempos de fermentación iniciales se agruparon en dos raíces con una similitud del 80% (Figura 5-III).

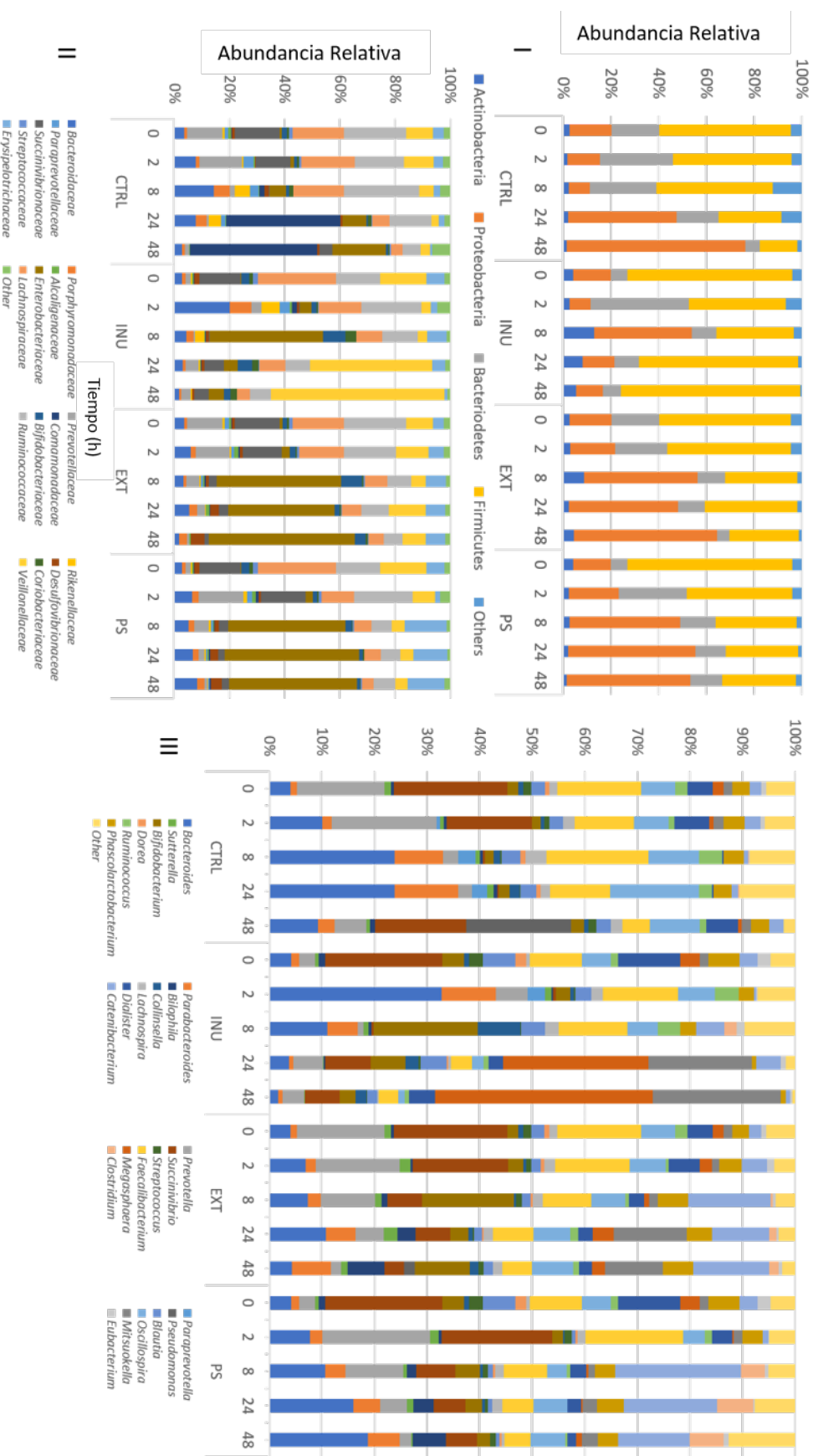


**Figura 5:** Recuento total de bacterias obtenido por RT-PCR (I), Beta diversidad mediante análisis de coordenadas principales (PCoA) de comunidades bacterianas de fermentaciones colónicas *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Silvetia compressa* (EXT), su fracción de polisacárido aislado (PS), inulina (INU) y control negativo (CTRL) (II) y (III) Análisis de clúster que muestra los resultados contrastantes entre CTRL e INU y los ligeros cambios observados para PS y EXT en comparación con la diversidad inicial de una microbiota intestinal humana sana. \*Los experimentos no conectados por letras denotan diferencias medias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

#### **10.4.2 Efecto de los sustratos de algas marinas sobre la composición de la microbiota intestinal humana y la cuantificación de cepas probióticas seleccionadas**

En la línea de base (0h), Firmicutes (55-69%) y Proteobacteria (16-18%) fueron los filos identificados más predominantes, seguidos de Bacteroidetes (7-20%) y Actinobacteria (3-4%) (Figura 6-I). La abundancia relativa de Proteobacterias aumentó en todos los tratamientos con el tiempo de fermentación alcanzando un máximo de 75, 60 y 54% a las 48 h para CTRL, EXT y PS, respectivamente. Por el contrario, la máxima abundancia relativa de Proteobacterias en la fermentación INU se observó a las 8 h, alcanzando el 41%. El filo Bacteroidetes presentó una abundancia relativa máxima entre 22 y 41% a las 2 h seguido de una disminución continua que alcanza entre 5 y 13% al final de la fermentación. La abundancia relativa de Firmicutes disminuyó con el tiempo de fermentación de 55-69% a 16-30% a las 48 h para todos los tratamientos excepto para INU. La abundancia relativa de Actinobacteria fue inicialmente baja (2-4%) para todos los tratamientos, pero alcanzó un máximo de 9 y 13% a las 8 h de fermentación con EXT e INU, respectivamente.

A un nivel taxonómico inferior y en todas las muestras, se identificaron 38 familias y 50 géneros, con una abundancia relativa superior al 1% de la comunidad establecida como límite (Figura 6-II y 6-III). Después de 48 h, el tratamiento EXT condujo a una menor abundancia de los géneros *Faecalibacterium* (16 - 6%) y *Collinsella* (1 - 0%) y, al mismo tiempo, aumentó la proporción de la familia *Enterobacteriaceae* (0.9 – 53.0%) y los géneros *Catenibacterium* (2.2 – 14.4%) y *Phascolarctobacterium* (3.3 – 5.83%) en comparación con la INU (Figura 6-II y 6-III). En particular, el EXT aumentó la abundancia de *Bifidobacterium* (18%) a las 8 h y fue similar a la abundancia con INU (20%). Después de 48 h, el tratamiento con los PS también aumentó la proporción de *Enterobacteriaceae* (0.4 - 46.4%), *Catenibacterium* (3.4 - 13.6%) y *Clostridium* (0.0 - 6.5%) en comparación con INU (Figura 6-II y 6-III). Las enterobacterias tuvieron un aumento notable en todos los sustratos evaluados, incluso en los experimentos con INU alcanzando hasta el 41%.



**Figura 6:** Cambios en la composición de la microbiota intestinal humana durante las fermentaciones colónicas *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Silvestra compressa* (EXT), su fracción de polisacáridos aislados (PS), inulina (INU) o un control negativo (CTRL) a nivel filo (I), familia (II) y género (III). \*Otros incluyen organismos con una abundancia relativa inferior al 1% o aquellos que no fueron identificados.

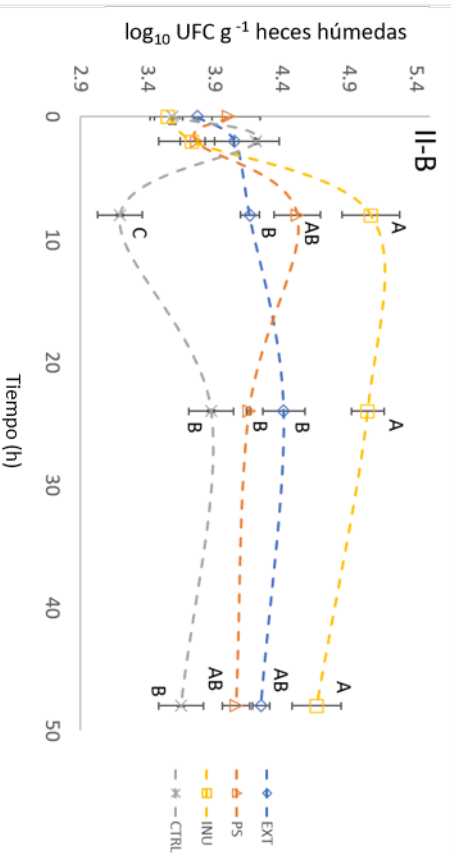
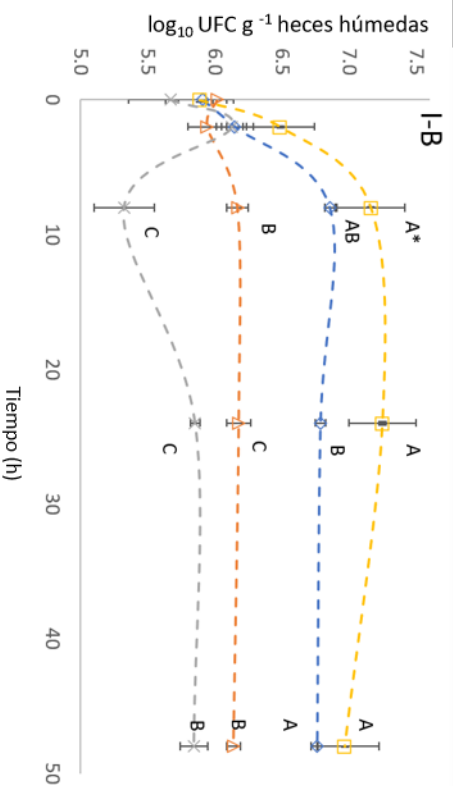
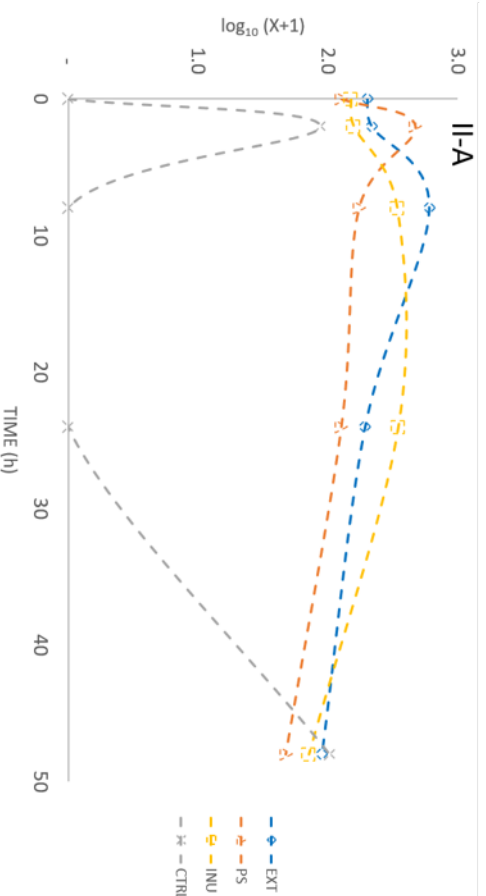
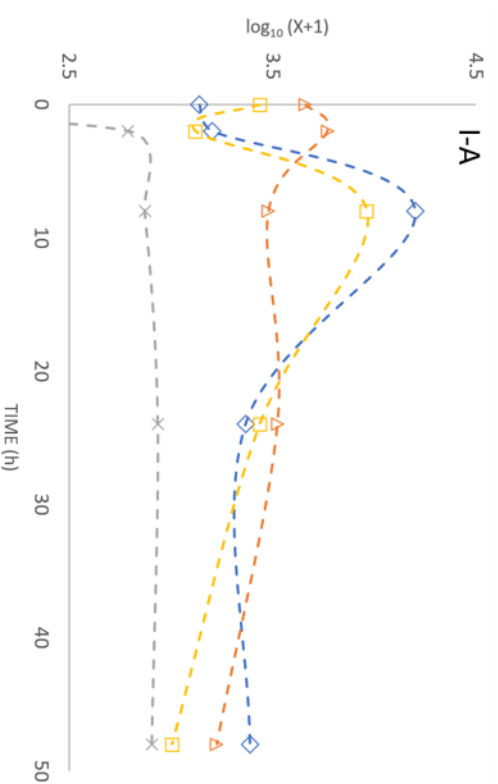


El análisis de correlación entre la concentración calculada por RT-PCR ( $\log_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de heces húmedas) y el  $\log_{10} (X + 1)$  de las abundancias absolutas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* obtenido por la secuenciación Illumina dio como resultado una correlación significativa para *Bifidobacterium* ( $p < 0.05$ ), pero no para el género *Lactobacillus* ( $p > 0.05$ ) (Figura 7). La INU generó el desarrollo más pronunciado de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* a las 24 h, con un resultado de  $\log_{10} 7.25$  y  $\log_{10} 5.06$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de heces húmedas, seguido del EXT (Figura 7 I-B y II-B). La fracción de PS promovió el crecimiento de bifidobacterias durante las primeras 8 horas, pero después de ese período no hubo diferencia significativa con el CTRL ( $p > 0.05$ ). Además, el crecimiento de *Lactobacillus* alcanzó el pico máximo a las 8 h de fermentación de PS, siendo  $\log_{10} 4.51 \pm 0.09$  UFC  $\text{g}^{-1}$  en heces húmedas, y no mostró diferencia significativa con INU ( $p < 0.05$ ). La fermentación del EXT alcanzó su recuento más alto de *Lactobacillus* ( $\log_{10} 4.42 \pm 0.15$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de heces húmedas) a las 24 horas, pero fue sólo el 43.04% del recuento alcanzado por INU.

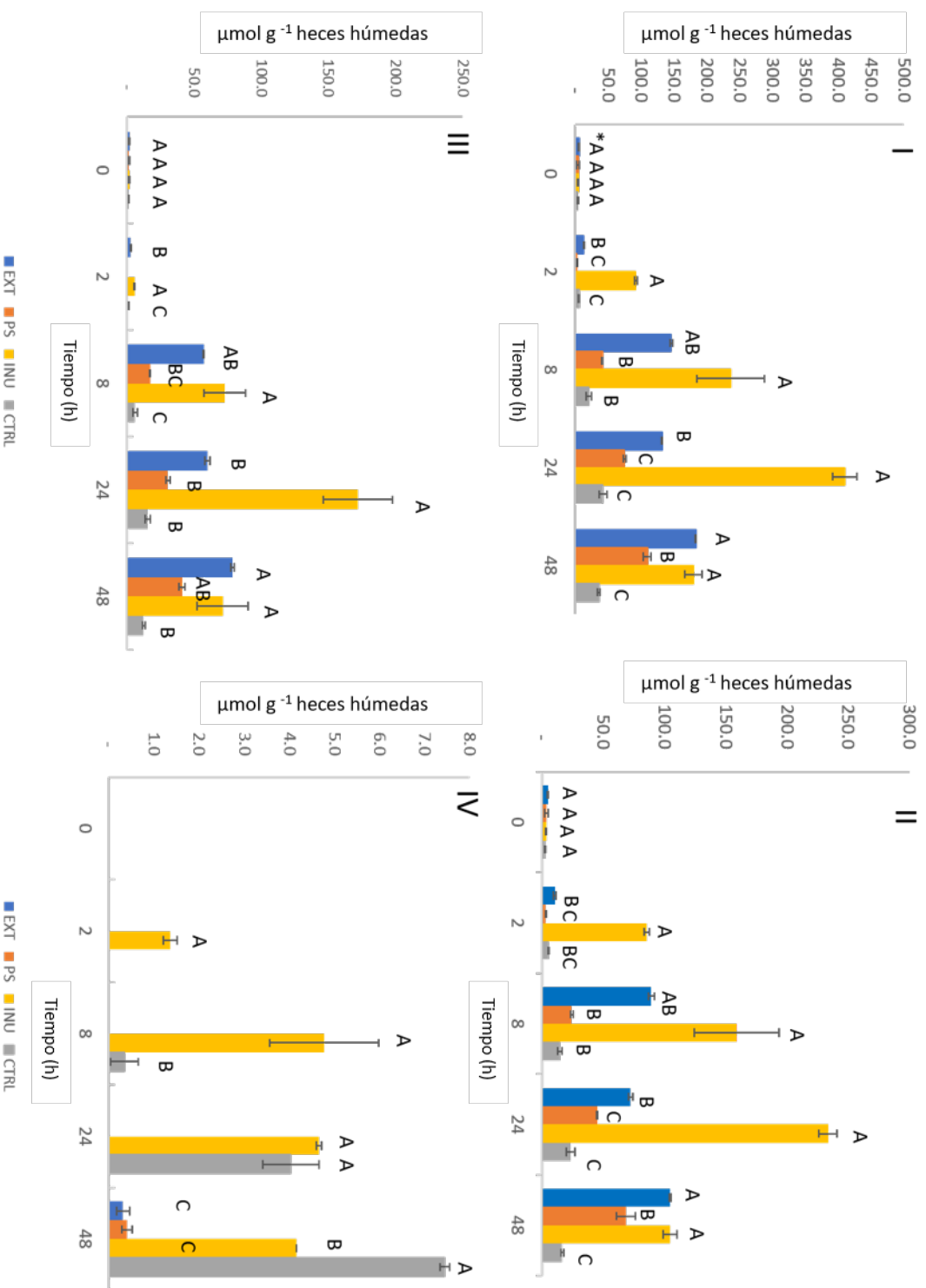
### 10.3.3 Síntesis de ácidos grasos de cadena corta

El sustrato utilizado en la fermentación colónica y la duración tuvieron un impacto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en las concentraciones de AGCC producidas durante el proceso de fermentación de 48 h (Figura 8). A las 48 h, la concentración total de AGCC (Figura 8-I) en la fermentación CTRL fue la más baja ( $42.74 \pm 6.09$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  heces húmedas) en comparación con los medios que contenían INU ( $410.44 \pm 18.77$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  heces húmedas), EXT ( $183.71 \pm 0.86$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  de heces húmedas), o PS ( $110.02 \pm 6.09$   $\mu\text{mol g}^{-1}$  de heces húmedas). Las muestras de INU y CTRL alcanzaron concentraciones máximas de ácidos acético y propiónico a las 24 h de fermentación, mientras que las muestras con EXT y PS alcanzaron concentraciones máximas a las 48 h. Después de 48 h de fermentación, EXT y PS produjeron 44.76 y 26.81% del total de AGCC obtenidos con INU a las 24 horas. EXT y PS redujeron la relación acetato / propionato después de 24 horas de fermentación ( $1.21 \pm 0.06$  y  $1.41 \pm 0.06$ , respectivamente), pero EXT presentó una disminución más pronunciada que INU ( $1.40 \pm 0.25$ ). Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por ambos sustratos de algas en comparación con los experimentos CTRL e INU (Figura 8-II y 8-III). EXT produjo un 78% más ácido acético, un 81% más ácido propiónico y un 4.09% del ácido butírico producidos por el CTRL. En comparación con INU, el EXT

produjo el 45%, 46% y 7% de los AGCC mencionados anteriormente. El PS produjo un 65.7% más ácido acético y un 50.1% más ácido propiónico que el CTRL y solo un 5.28% del ácido butírico. En comparación con INU, el PS produjo 29.4% y 9.47% del ácido acético y ácido propiónico, respectivamente. En los experimentos con INU y CTRL, se observó la síntesis de ácido butírico después de dos y ocho horas de fermentación (Figura 8-III).



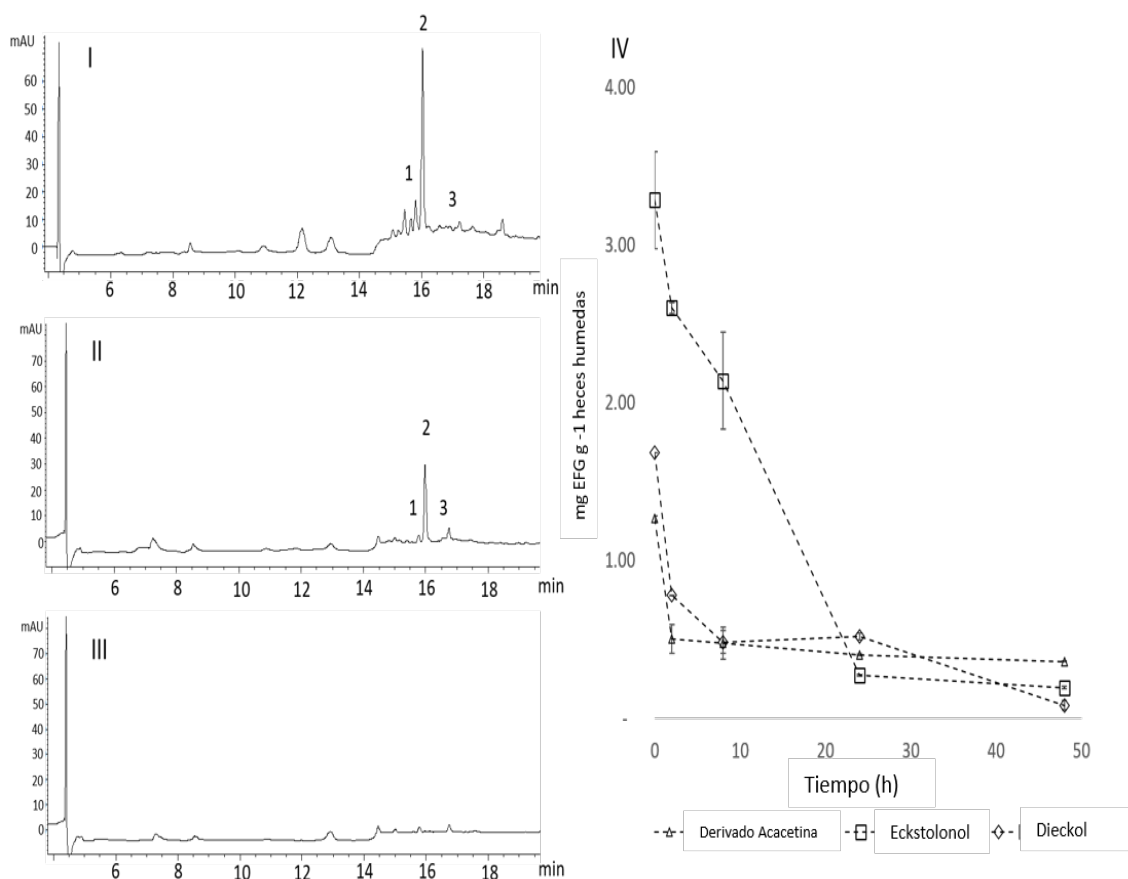
**Figura 7:** Abundancia absoluta  $\log_{10}(X + 1)$  del género *Bifidobacterium* durante la fermentación colónica *in vitro* del extracto hidroetanólico (EXT) de *Silvetia compressa*, su fracción de polisacárido aislado (PS), inulina (INU) o un control negativo (CTRL) (I-A) y cuantificación mediante RT-PCR (I-B) y abundancia absoluta  $\log_{10}(X + 1)$  del género *Lactobacillus* (II-A) y cuantificación mediante RT-PCR (II-B). \* Letras diferentes en cada denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 8:** Cambios en las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta más abundantes (AGCC) [I. Concentración total de AGCC, II. Ácido acético y III. Ácido propiónico y IV. Ácido butírico] durante la fermentación colónica *in vitro* del extracto hidroetanólico (EXT) de *Silvestia compressa*, su fracción de polisacáridos aislada (PS), inulina (INU) o un control negativo (CTRL). \* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

#### 10.3.4 Cuantificación de florotaninos durante la fermentación *in vitro*

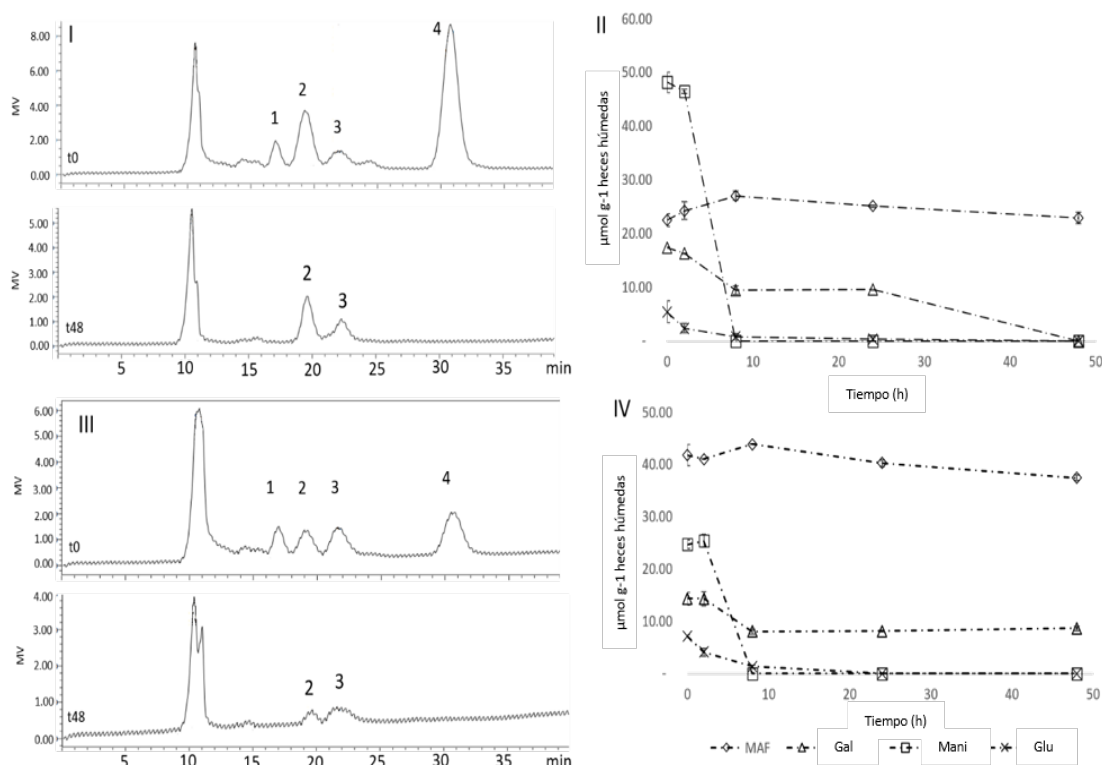
Se detectaron tres compuestos fenólicos solo en las fermentaciones con el EXT. Estos compuestos incluyen un flavonoide derivado de la acetina y eckstolonol y dieckol, que son dos PT (Figura 9). El eckstolonol fue el más abundante con  $3.28 \pm 0.31$  mg de PE g<sup>-1</sup> de heces húmedas (Figura 9 - IV). En este estudio, se observó una correlación inversa entre la producción de AGCC y el contenido total de florotaninos (eckstolonol y derivado de acetina) ( $p \leq 0.05$ ). En general, el contenido de PT tuvo una correlación inversa con la cuantificación de *Bifidobacterium* ( $p < 0.0001$ ), *Lactobacillus* ( $p = 0.022$ ) y bacterias totales ( $p = 0.0148$ ), así como con la síntesis de ácido acético ( $p = 0.0003$ ), ácido propiónico ( $p < 0.0001$ ) y producción total de AGCC ( $p = 0.0001$ ). Estos efectos se atribuyeron principalmente a la concentración de eckstolonol ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9:** Cromatogramas obtenidos a 270 nm que muestran los cambios en las concentraciones del derivado de acetina (1), eckstolonol (2) y dieckol (3) en los sobrenadantes obtenidos a 0 (I), 8 (II) y 48 h (III) de la fermentación colónica *in vitro* del extracto hidroetanólico (EXT) de *Silvetia compressa* y los cambios expresados por gramo de heces utilizadas como inóculo (IV).

### 10.3.5 Cuantificación de carbohidratos durante la fermentación *in vitro*

Los monosacáridos detectados e identificados durante las fermentaciones colónicas se muestran en la Figura 10. El manitol y la glucosa fueron las primeras fuentes de carbono en agotarse, seguidas de la galactosa y la fracción manosa + arabinosa + fucosa (MAF). En particular, no se detectó manitol después de 8 horas de digestión gastrointestinal *in vitro*. La glucosa y la galactosa fueron el segundo y tercer monosacáridos que se consumieron. En las fermentaciones EXT y PS, la glucosa se agotó después de 24 h. La galactosa disminuyó 42.8% y 39.62% durante las primeras ocho horas de fermentación en EXT y PS respectivamente, manteniendo su concentración prácticamente estable en adelante. La glucosa y la galactosa presentaron una fuerte correlación significativa con las cantidades de ácido acético, ácido propiónico, AGCC totales, así como con el crecimiento de *Bifidobacterium*, pero la correlación con la bacteria *Lactobacillus* no fue significativa ( $p > 0.05$ ).



**Figura 10:** Cromatogramas obtenidos por HPLC-IR que muestran las diferencias en las concentraciones de glucosa (Glu) (1), galactosa (Gal) (2), manosa + arabinosa + fucosa (MAF) (3) y manitol (Mani) (4) en los sobrenadantes de las fermentaciones colónicas *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Silvetia compressa* (EXT) a la 0 h (t<sub>0</sub>) y 48 h (t<sub>48</sub>) (I) y cambios expresados por gramo de heces utilizadas como inóculo para la fermentación EXT de 48 h (II), Cromatogramas obtenidos para la fracción de polisacáridos aislados (PS) (III) y los correspondientes cambios de concentración durante las 48 horas de fermentación (IV).

#### 10.4 Discusión

Los resultados muestran que el EXT y los PS del alga *S. compressa* y la INU producen un aumento en el recuento total de bacterias después de 8 h de fermentación colónica en comparación con el control negativo. Esto coincide con lo observado por Charoensiddhi et al. (2016) en una fermentación colónica *in vitro* con extractos de *Ecklonia radiata*.

En nuestro estudio la INU, que se utilizó como control, promovió un mayor crecimiento de bacterias totales que los extractos. A medida que aumentó el tiempo de fermentación, las comunidades bacterianas en el grupo CTRL contrastaron con las observadas en los grupos INU, EXT y PS. La diferenciación entre poblaciones ocurrió desde las horas iniciales de fermentación, lo que indica los efectos de la disponibilidad inicial de nutrientes limitaron el crecimiento de bacterias responsables de metabolizar los sustratos disponibles (degradadores primarios). El agotamiento de los sacáridos promovió una diversificación al desafiar a las bacterias a cambiar a otros sustratos menos eficientes y atenuó el crecimiento de especies de rápido crecimiento para favorecer a competidores más especializados (Vieira-Silva et al. 2016). Esto se observó para el tratamiento con INU después de 24 h y luego para EXT a las 48 h (Figura 1-III). Reportes previos con otros extractos de algas, principalmente constituidos por polisacáridos, también mostraron diferenciación en la diversidad de la microbiota intestinal (Duan et al. 2019; Xu et al. 2019; Zhang et al. 2020).

Los resultados obtenidos muestran principalmente el desarrollo de cuatro filos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria. Proteobacteria es un filo vasto y diverso que se encuentra comúnmente en la microbiota intestinal de humanos sanos (Zhang et al. 2020). Se considera un filo subdominante, que representa no más del 10% de la población MIH (Binda et al. 2018; Gotteland et al. 2020) que responde a factores ambientales, como la dieta (Shin et al. 2015). En un estado saludable estable, la abundancia relativa de proteobacterias en el intestino humano puede aumentar transitoriamente hasta un 45% sin signos clínicos (Caporaso et al. 2011). Las especies de Bacteroidetes están asociadas con enzimas que degradan polisacáridos (Tandon et al. 2018) y típicamente producen una mezcla de AGCC, como los ácidos acético y propiónico. El filo Firmicutes está asociado con la fermentación de mono y disacáridos (Vieira-Silva et al. 2016) y con la síntesis de ácido butírico (Unno y Osakabe 2018). Actinobacteria es otro filo

subdominante que consiste en bacterias grampositivas, principalmente representadas en la MIH por el género probiótico *Bifidobacterium*, cuya presencia se asocia con la prevención de enfermedades *vitro* intestinales y la modulación del sistema inmunológico (Zhang et al. 2020).

El desarrollo de la familia *Enterobacteriaceae* obtenido en nuestro estudio corrobora lo obtenido en fermentaciones colónicas *in vitro* previas, donde se reportó un desarrollo pronunciado de la familia *Enterobacteriaceae* utilizando diversos polifenoles de salvado de avena (Kristek et al. 2019). Este crecimiento se observó previamente en otros sistemas intestinales *in vitro*; Blatchford et al. (2019) mencionan que esta proliferación puede atribuirse a condiciones de crecimiento alteradas en ensayos *in vitro* tales como (a) un medio de crecimiento enriquecido, (b) atmósfera gaseosa subóptima (anaerobiosis comprometida), y (c) el uso de un modelo de fermentación que aumenta la acumulación de biomoléculas y desechos que normalmente serían eliminados por absorción o excreción *in vivo*.

Los resultados contrastantes entre el recuento de bacterias probióticas (Q-PCR) y las abundancias totales (Secuenciación Ilumina), particularmente para los resultados obtenidos con el género *Lactobacillus*; tienen fundamento en que la correspondencia entre las técnicas de cuantificación en tiempo real y la secuenciación disminuye en el extremo más bajo del rango de abundancia debido a la eficiencia de amplificación de PCR relativamente más baja y al aumento de la estocasticidad de los resultados para taxones de baja abundancia en la secuenciación de genes (Gonzalez et al. 2012; Jian et al. 2020). Charoensiddhi et al., (2016) reportaron hallazgos similares con extractos del alga parda *Ecklonia radiata*, utilizando una fracción de polisacáridos ellos encontraron un menor crecimiento de *Bifidobacterium* después de 24 h de fermentación en contraste con la inulina o el extracto de Celluclast (Charoensiddhi et al. 2016).

La elevada producción de ácido acético y propiónico presente en las fermentaciones del EXT y los PS se considera un signo de prebiosis. El ácido acético tiene un papel clave como fuente de energía para el tejido periférico y sustrato para la síntesis de colesterol (Wang et al. 2018). El ácido propiónico es un factor hipolipídico que reduce los niveles de colesterol sérico (Ramnani et al. 2012). La disminución de la relación ácido acético/



ácido propiónico se considera un signo de actividad hipolipidémica, que inhibe la biosíntesis del colesterol al inhibir la actividad de la HMG-CoA reductasa en el hígado del hospedero (Rodrigues et al. 2015; Weitkunat et al. 2015, 2016, 2017; Wang et al. 2018; Strain et al. 2020). De acuerdo con otros estudios, los ácidos acético y propiónico fueron los principales AGCC detectados en la fermentación de extractos de algas como *S. muticum*, *O. pinnatifida* (Rodrigues et al. 2016), *Ecklonia radiata* (Charoensiddhi et al. 2016; Charoensiddhi et al. 2017b), *Gracilaria spp*, *Gelidium sesquipedale* y *Ascophylum nodosum* (Ramnani et al. 2012).

El perfil de síntesis de AGCC obtenido en las fermentaciones con sustratos derivados del alga *S. compressa* (EXT y PS), particularmente el ácido acético y propiónico, fue similar al reportado para la fermentación *in vivo* e *in vitro* del alginato y sus derivados de bajo peso molecular (Wang et al. 2006; Ramnani et al. 2012; Li et al. 2016). Las concentraciones de ácido acético y propiónico y la disminución de su relación durante las fermentaciones con el EXT y los PS se han asociado previamente al crecimiento de microorganismos pertenecientes a los géneros *Bilophila*, *Catenibacterium*, *Phascolarctobacterium*, *Bifidobacterium* y *Mitsuokella* (Figura 2-III) (Kageyama y Benno 2000; Gorham et al. 2017; Han et al. 2019; Ikeyama et al. 2020).

La síntesis del ácido butírico presentó resultados contrastantes en todas las fermentaciones realizadas. La síntesis de este ácido se considera un importante marcador de prebiosis, ya que es una fuente de energía para las células epiteliales del colon y puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y la expresión genética en las células intestinales; posiblemente previniendo el desarrollo de cáncer de colon y la inflamación del colon (De Vuyst y Leroy 2011). La MIH es un entorno competitivo, y la síntesis de ácido butírico ha demostrado estar mediada tanto por degradadores primarios (hidrólisis parcial de polisacáridos) como por degradadores secundarios (síntesis dependiente de ácido acético, láctico y succínico) (De Vuyst y Leroy 2011). La producción de ácido butírico en la fermentación del CTRL puede haber estado relacionada con el consumo de ácido acético por degradadores secundarios, mientras que en los experimentos con INU los degradadores primarios produjeron monosacáridos y oligosacáridos (FOS) disponibles para el consumo de otros degradadores secundarios butirógenos (Baxter et al. 2019). En la

fermentación del CTRL, los resultados de la secuenciación Illumina mostraron que la abundancia relativa de degradadores primarios, como *Lachnospira*, *Ruminococcus*, *Succinivibrio*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, aumentó durante las primeras 24 h, lo que podría haber facilitado el crecimiento de bacterias responsables de la producción de ácido butírico (Figura 6-II). Por el contrario, los oligómeros FOS en la fermentación de la INU se han asociado previamente con el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (De Vuyst y Leroy 2011) y, en consecuencia, con el aumento de degradadores secundarios (por ejemplo, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Eubacterium rectale*) implicados en la producción de ácido butírico (Figura 2-II) (Flint et al. 2012).

La disminución de la concentración de PT en la fermentación del EXT abre la puerta a un posible consumo de estos compuestos fenólicos por parte de miembros de la MIH. Anteriormente, las únicas actividades *in vitro* reportadas para los PT relacionados con la MIH fueron (1) la inhibición de bacterias patógenas (Charoensiddhi et al. 2017b), (2) la posible transformación de PT de alto peso molecular en oligómeros para su absorción en el intestino grueso (Corona et al. 2016, 2017), y (3) la inhibición del crecimiento de las células HT-29 y la reducción del daño del ADN inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células del colon (Montero et al. 2016). Recientemente la administración de eckol *in vivo* resultó en un aumento de la abundancia relativa de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en ratones generando propiedades antiinflamatorias al reclutar células dendríticas CD11c<sup>+</sup> en tejido de colon inflamado (Zhu et al. 2020).

Según reportes anteriores, la producción de AGCC se ve afectada por los PT, particularmente cuando provienen de extractos crudos (Charoensiddhi et al. 2017b). Los flavonoides de acetina en la MIH parecen ser degradados y metabolizados en formas menos complejas por miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (géneros *Escherichia* y *Enterococcus*) debido a que facilitan su absorción (Gowd et al. 2019). Además, la acetina podría mejorar la adhesión de *Lactobacillus acidophilus* en el intestino grueso al aumentar la actividad de SrtA, que es la enzima responsable del anclaje a la pared celular de las proteínas dependientes de la sortasa (Wu et al. 2020). Se ha demostrado que otros compuestos fenólicos como los flavonoides (por ejemplo, quercetina y catequina) y el

resveratrol estimulan el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Huang et al. 2016b; Loo et al. 2020).

Los PT en conjunto con los PS tuvieron un papel importante en la actividad prebiótica del EXT. La gama de actividades prebióticas que muestran los compuestos fenólicos en las fermentaciones colónicas *in vitro* están relacionadas con mecanismos de alimentación cruzada, desarrollo probiótico y regulación de factores de virulencia de cepas patógenas (Loo et al. 2020). También se ha demostrado que los flavonoides, los extractos de florotaninos y varios extractos enriquecidos en polifenoles ayudan al desarrollo del filo Proteobacteria, la familia *Enterobacteriaceae* y los géneros *Escherichia* y *Hafnia* (una nueva bacteria probiótica anti-obesidad productora de ácido láctico) (Huang et al. 2016b; Charoensiddhi et al. 2017b; Kristek et al. 2019). El desarrollo de proteobacterias revela un papel importante en la MIH y está relacionado con la capacidad de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* para metabolizar compuestos fenólicos debido a sus actividades de O-glucosidasa, O-desmetilasa y deshidroxilasa (Cortés-Martín et al. 2020). Los ácidos fenólicos pueden atenuar selectivamente el crecimiento de bacterias patógenas sin comprometer las bacterias comensales y probióticas en el intestino, pero se requiere más investigación para estudiar el efecto de los compuestos fenólicos y florotaninos en los miembros comensales, probióticos y patógenos de la familia *Enterobacteriaceae* (Charoensiddhi et al. 2017b; Loo et al. 2020).

Los monosacáridos detectados durante las primeras etapas de la fermentación (Figura 6) se relacionaron con la hidrólisis parcial producida por la alta energía de la extracción de polisacáridos asistida por ultrasonido. Estos polisacáridos, que incluyen laminarina y fucoidan, están compuestos principalmente por galactosa, fucosa, manosa y / o xilosa (García-Ríos et al. 2012). La presencia de manitol es común en la familia Phaeophyceae y es uno de los principales productos de su fotosíntesis (Lalegerie et al. 2020). Se estima que el 25% del manitol ingerido se absorbe en el intestino delgado y luego se excreta en la orina (Xiao et al. 2013). La diferencia en el contenido de manitol entre EXT y PS se puede atribuir al paso de precipitación de PS ya que es ligeramente soluble en disolventes orgánicos como metanol y etanol (Lama-Muñoz et al. 2020; Su et al. 2020). Antes de este estudio, no existen reportes del manitol metabolizado *in vitro* por consorcios de bacterias

fecales de MIH (Ruiz-Ojeda et al. 2019), pero se ha reportado que mejora la producción de AGCC y el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 en comparación con maltodextrina o inulina (Liong y Shah 2005). La suplementación de manitol ha promovido el desarrollo de cepas aisladas de *Lactobacillus sp* FTDC 2113 y *L. acidophilus* FTDC 8033 en leche de soya, así como la síntesis de ácido láctico (Yeo y Liong 2010). Esta capacidad de las bacterias ácido-lácticas para metabolizar el manitol se atribuye al mecanismo alternativo de oxidación de NADH-H<sup>+</sup> de la NADH oxidasa que afecta la capacidad de crecer en sustratos químicamente más reducidos que la glucosa, como el manitol.

## 11. CAPITULO 3: MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO DE *Silvetia compressa*

### 11.1 Resumen

El alga *Silvetia compressa* y sus extractos hidroetanólicos asistidos con ultrasonido poseen componentes bioactivos, como los florotaninos y los polisacáridos, con diversos beneficios para la salud incluyendo actividad antioxidante, actividades inhibitoras de enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, actividades hipocolesterolémicas e hipoglucemiantes probadas *in vivo*, potencial anticancerígeno, efecto prebiótico *in vitro* etc. Sin embargo, la utilización de extractos como ingredientes funcionales está limitada debido a la inestabilidad de los compuestos activos. Tanto los florotaninos como los polisacáridos presentan retos de estabilización fisicoquímica gracias a sus propiedades antioxidantes y su capacidad de retención y captación de agua del ambiente (pegajosidad), por lo que es necesario plantear un protocolo de estabilización para evitar la degradación de ambos activos y prolongar la vida útil de los extractos de *S. compressa*. En el presente trabajo se realizó la caracterización de la recuperación de producto y estabilización de las propiedades fisicoquímicas de los polvos microencapsulados del extracto hidroetanólico de *S. compressa* (contenido de humedad, higroscopia, densidad aparente aireada, densidad aparente compacta, propiedades de fluidez y solubilidad) mediante secado por aspersión utilizando dos relaciones de temperatura de entrada/temperatura de salida ( $T_I/T_O$  180/90 y 150/75 °C), y 6 tipos de acarreadores poliméricos (tres acarreadores puros (1) maltodextrina (MD) 2) hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) 3) proteína de suero de leche (WP), y tres mezclas (HPMC/MD 50:50, goma acacia GA/MD 40:60 y HPBCD/MD 50:50).

Se observó una mejor recuperación en aquellos productos donde se utilizaron las mezclas acarreadoras de MD/HPMC y MD/GA. El proceso de microencapsulación permitió obtener polvos con un bajo contenido de humedad menor al 10%. Se obtuvieron productos con una elevada solubilidad que se vio afectada por la temperatura de secado, disminuyendo al operar con una relación 180/90°C. Se mejoraron las propiedades fisicoquímicas del extracto hidroetanólico al reducir el contenido de humedad y

pegajosidad. Los resultados demostraron que la tecnología de secado por aspersión podría aplicarse para transformar el extracto en polvo con las propiedades deseadas.

## 11.2 Introducción

El género *Silvetia* pertenece a la familia Fucaceae (Fucales, Phaeophyceae); y se utiliza como ingrediente alimentario en países asiáticos (Pereira 2016), así como para la biorremediación (Girardi et al. 2014). *Silvetia compressa* (J. Agardh; E. Serrão, TO Cho, SM Boo & Brawley), anteriormente conocida como *Pelvetia fastigiata* (J. Agardh; De Toni), es un miembro común de la comunidad fucoide intermareal superior en la costa del Pacífico de Norte América desde el condado de Humboldt, California, hasta Punta Baja, Baja California, México, incluidas las islas costeras (Silva et al. 2004; Pedroche et al. 2008). *Silvetia compressa* tiene aplicaciones industriales potenciales como fertilizante, forraje y materia prima para la extracción de alginato y otros coloides utilizados como espesantes en la industria alimentaria (Aguilar-Rosas et al. 2002). Se ha encontrado que la harina del alga y sus extractos hidroetanólicos ricos en florotaninos (PT) y polisacáridos (PS) poseen una gran variedad de actividades que promueven la salud: hipocolesterolémica en ratas Wistar (Acevedo-Pacheco et al. 2020), antiviral (Morán-Santibañez et al. 2016), antioxidante, así como actividades inhibitoras de la  $\alpha$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -amilasa *in vitro* (Múzquiz et al. 2019) y actividad prebiótica. Esta alga es rica en fucoidan (11-12,1%), polisacáridos sulfatados (15-16%) (Hernández-Garibay et al. 2019), fibra dietética soluble (9,1%), fibra dietética insoluble (50,1%), contenido de fenólicos totales (28%) y PT (0,73%) (Múzquiz et al., 2019; Tapia-Salazar et al., 2019; Vázquez-Rodríguez et al., 2020). Para capitalizar los beneficios a la salud y concluir el desarrollo de un potencial ingrediente funcional es necesario traducir todos estos beneficios en una formulación estable del extracto biológicamente activo.

El secado por aspersión (SA) es una tecnología donde rápidamente se obtiene un producto en polvo al atomizar una alimentación líquida en una cámara caliente y seca (Ameri y Maa 2007). El SA consta de cuatro fases principales: (1) atomización de la alimentación, (2) evaporación del agua libre, (3) evaporación del agua ligada y (4) recuperación del producto (van't Land 2012). La tecnología de microencapsulación (ME) es una tecnología con aplicaciones en las industrias alimentarias y biotecnológicas (Kwak 2014). La ME es

el proceso mediante el cual los “materiales de núcleo” (enriquecidos en compuestos bioactivos, probióticos, etc) se empaquetan dentro de los “materiales de pared” para formar cápsulas (Gouin 2004). Este método permite conservar y proteger compuestos funcionales, como enzimas, compuestos polifenólicos, enzimas y micronutrientes (carotenos, xantofilas, etc) de las condiciones adversas presentes en el exterior y durante el almacenamiento; además de una vez ingeridos llevarlos al órgano diana de manera controlada y protegerlos del entorno *in vivo* adverso (Kwak 2014). Las cápsulas que varían de 3 a 800  $\mu\text{m}$  de tamaño se denominan microcápsulas. Es importante la correcta formulación de solución alimentada al SA en términos de 1) contenido de sólidos, 2) selección de “material pared” (acarreador) y “material nucleico” y su concentración y 3) viscosidad pues determinaran el rendimiento del producto seco y el grado de encapsulación. La ME-SA es una tecnología adecuada para la formulación de nuevos productos derivados del alga parda *S. compressa*, debido a su capacidad para mejorar la solubilidad, reducir el contenido de humedad (que aumenta la estabilidad microbiológica y química) (Gharsallaoui et al. 2007), la biodisponibilidad y dependiendo del “material pared” o acarreador seleccionado permite una liberación controlada mejorada de los compuestos activos en alimentos y productos farmacéuticos (Rezvankeh et al. 2019). El secado por aspersión se ha aplicado en la producción de fórmulas estables microencapsuladas de productos farmacéuticos (Salama 2019), nutracéuticos (Navarro-Flores et al. 2020) y aditivos alimentarios, como colorantes, antioxidantes y conservantes (Assadpour y Jafari 2019).

La producción de polvos y microencapsulados utilizando jugos y jarabes concentrados ha mejorado la vida útil y los costos de transporte en la fabricación de bebidas de frutas, incluidos los jugos de goldenberry (Eitzbach et al., 2020), y de tamarindo y naranja (Goula y Adamopoulos, 2010). El secado por aspersión de este tipo de soluciones es complicado, porque cuando la solución está en contacto con el flujo de aire caliente, la rápida remoción del agua produce materiales amorfos en la superficie de las gotas, traducido en pegajosidad del producto (Cortés et al., 2017). Este efecto se produce debido a la alta concentración de azúcares simples y ácidos orgánicos de cadena corta, propiamente debido a la baja temperatura de transición vítrea de estos compuestos ( $T_g$ ) (Bhusari et al., 2014). Se requiere el uso de un agente portador para evitar productos altamente

higroscópicos y pérdida de producto debido a la adhesión en las paredes del secador y la cohesión entre partículas.

Previamente se ha utilizado esta tecnología para la estabilización y microencapsulación de extracto de *Sargassum plagyophyllum* utilizando maltodextrina DE 10-15 y temperatura de entrada al secador de 110°C (Anwar et al. 2018). Norbrillinda et al. (2016) lograron la optimización de microencapsulación usando secado por aspersión de un extracto colorante de *Sargassum muticum* utilizando maltodextrina DE 10 con temperaturas de entrada entre 140 y 180°C (Norbrillinda et al. 2016). La tecnología de secado por aspersión también se ha usado para la estabilización y microencapsulación de bioactivos recuperados de algas, como la fucoxantina (xantofila altamente antioxidante con propiedades anti obesidad presente en gran variedad de algas pardas) extraída de *Undaria pinnatifida* (Sun et al. 2018) y los florotaninos totales de *Sargassum serratum* (Cuong 2020); para la microencapsulación de la fucoxantina se utilizaron maltodextrina, proteína de suero y goma arábiga como acarreadores a una temperatura de entrada en el secador de 170°C, mientras que para los fenólicos totales de *Sargassum serratum* se utilizó maltodextrina, sacarosa y glucosa utilizando temperaturas de entrada al secador en un rango de 110°C a 160°C. También existen reportes del uso de extracto ME-SA patentado de *Laminaria digitata*, con elevadas concentraciones de fucoïdan y laminaran como antioxidantes en producto cárnicos a base de cerdo (Moroney et al. 2013).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las condiciones de secado adecuadas (Relación temperatura de entrada/temperatura de salida y tipo de agente portador) para obtener una alta recuperación de producto polvo extracto de *S. compressa* y características fisicoquímicas adecuadas como una elevada solubilidad del polvo en agua, bajos valores de higroscopia, un bajo contenido de humedad residual y elevados valores densidad aparente aireada y densidad aparente compactada.



## 11.3 Materiales y Métodos

### 11.3.1 Alga y reactivos

El alga *Silvetia compressa* fue recolectada en Baja California, México. Se recolectaron muestras de alga de diciembre de 2014 a enero de 2015 de la Escalera Baja California Sur, México. Se recogió la parte superior de las algas, luego se lavó varias veces con agua de mar para eliminar la arena y las epífitas, se escurrió sobre piedra limpia o tendederos y se secó al sol dentro de una sombra de invernadero, molida (modelo 200, Pulvex) con un tamiz de 500  $\mu\text{m}$  y se empacó al vacío hasta su uso.

Los diversos agentes portadores evaluados fueron: 1) Maltodextrina. Maltrin M100 (MD, DE 10) de Industrias Alimentarias de Monterrey, México; 2) hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, Pharmacoat 603, Shin-Etsu) de DVA Mexicana S.A de C.V., México; 3) goma acacia (GA) de Central de Drogas S.A. de C.V, México; 4) beta-hidroxipropilciclodextrina (HPBCD) de DVA Mexicana S.A de C.V, México, y 5) proteína de suero de leche (WP) de Central de Drogas S.A. de C.V, México. Se utilizó cloruro de sodio de Desarrollo de Especialidades Químicas SA de CV, México, para la determinación de la higroscopia.

### 11.3.2 Preparación del extracto y de las soluciones alimentadas al secador

La obtención de los extractos de muestras de harina de *S. compressa* se realizó mediante extracción asistida por ultrasonido como detallan Vázquez-Rodríguez et al. (2020). Se suspendieron alícuotas experimentales en etanol acuoso al 32.33% usando una relación disolvente / alga de 30 ml g<sup>-1</sup> de alga seca. Las suspensiones de alícuotas se colocaron en un baño de hielo y se sonicaron (SFX150 Cell Disruptor, Branson, New Carlisle, IN, EE. UU.) durante 30 minutos con una densidad de potencia de 3.8 W cL<sup>-1</sup>, utilizando una micropunta de 1/16" con una profundidad de inmersión de 10 cm. Luego se mezcló a 250 rpm y 50 ° C durante 90 min en una plancha de calentamiento con agitación. Posteriormente, las suspensiones se centrifugaron a 685 g durante 15 min a 4 ° C (SL16R Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) y el sobrenadante se transfirió a un evaporador (evaporador Rocket Synergy, Genevac, Ipswich, Reino Unido) para eliminar el etanol y el agua. Finalmente, los extractos brutos se almacenaron a -80 ° C hasta su posterior análisis.

El contenido de sólidos del extracto optimizado se determinó por triplicado. Se colocaron 20 mL de extracto en una charola de aluminio y se secaron hasta peso constante en un horno (1305, VWR, Tultitlan, México). Se pesó y se calculó la cantidad de sólidos determinando los gramos restantes en cada charola. Para la preparación de las soluciones alimentadas se evaluaron seis formulaciones en las que se eligió la MD como vehículo base para las mezclas. Los acarreadores y extracto se combinaron hasta que los vehículos representaron el 50% de los sólidos de alimentación totales en cada experimento. Cada solución de extracto y acarreadores (alimentación líquida) se preparó con agua desionizada, se mezcló hasta su completa disolución.

#### **11.3.4 Secado por aspersión**

La alimentación líquida se microencapsuló utilizando un secador por aspersión con flujo en paralelo; (ADL311-A, Yamato Scientific Co., Tokio, Japón). Se utilizaron las relaciones  $T_I/T_O$  previamente mencionadas (180/90 y 150/75 °C). La alimentación líquida se ajustó para estabilizar la temperatura de salida. El flujo de aire de secado se fijó en 0.5 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. La presión de aspersión se fijó en 0.13 MPa. Una vez finalizado el experimento, el producto resultante se almacenó en una bolsa de aluminio sellada y en un desecador hasta su análisis. Cada experimento se realizó por duplicado.

#### **11.3.5 Recuperación de producto**

La recuperación de producto de todos los experimentos se expresó como un porcentaje y se determinó usando la Ec. 1, donde  $P_R$  es la recuperación del producto,  $m_p$  es la masa del producto expresada en gramos y  $m_o$  es la masa de sólidos presentes en la solución de alimentación expresada en gramos.

$$(1) P_R = \frac{m_p}{m_o} \times 100$$

#### **11.3.6 Contenido de Humedad**

Para la determinación del contenido de humedad, se utilizaron los métodos descritos por Bhusari et al. (2014). Se esparcieron uniformemente cinco gramos del producto resultante en una placa de aluminio y se colocaron en un horno de secado a 105 °C (1305, VWR, Tultitlan, México). Se registró el peso hasta alcanzar un peso constante. El contenido de humedad se expresó como porcentaje y se determinó usando la Ec. 2, donde  $M_C$  es el

contenido de humedad,  $m_{DP}$  es la masa del producto a peso constante,  $m_{AD}$  es la masa del plato de aluminio y  $m_P$  es la masa inicial del producto antes de peso constante, esta prueba se realizó inmediatamente después de que se recuperó el producto.

$$(2) M_C = \frac{m_{DP} - m_{AD}}{m_P} \times 100$$

### 11.3.7 Higroscopia

Para la determinación de la higroscopia, se utilizaron los métodos descritos por Nishad et al. (2017). Se esparcieron uniformemente cinco gramos del producto seco resultante en un plato de aluminio y se colocaron en un desecador lleno con una solución saturada de cloruro de sodio (75-78% de humedad relativa) a 21°C durante un intervalo de 7 días. La ganancia de peso de las muestras se registró pesando las muestras al comienzo del experimento hasta que se alcanzó un peso constante. La higroscopia de los polvos se expresó como un porcentaje y se determinó usando la Ec. 3, donde H es la higroscopia,  $m_H$  es la masa del producto a peso constante después de un intervalo de 7 días,  $m_{AD}$  es la masa del plato de aluminio y  $m_P$  es la masa inicial del producto antes del peso constante. Esta evaluación se realizó inmediatamente después de que se recuperó el producto.

$$(3) H = \frac{m_{HC} - m_{AD} - m_P}{m_P} \times 100$$

### 11.3.8 Densidad aparente aireada y densidad aparente compacta

La densidad aparente aireada ( $\rho_B$ ) y la densidad aparente compacta ( $\rho_T$ ) se midieron de acuerdo con los métodos modificados de Nishad et al. (2017). La densidad aparente se midió utilizando una probeta de diez mililitros y se llenó con el producto final y se registró el peso. El  $\rho_B$  se calculó como la relación entre la masa y el volumen de la muestra sin ninguna fuerza externa. La densidad compacta se determinó usando la misma muestra para la densidad aparente, pero el volumen se tomó para los cálculos después de golpear sutilmente hasta que el volumen no presento ningún cambio. Los resultados se calcularon utilizando las ecuaciones (5) y (6) y se expresaron en gramos por litro; donde  $\rho_B$  es la densidad aparente,  $\rho_T$  es la densidad compacta, m es la masa del producto en el cilindro de vidrio,  $V_C$  es el volumen de la probeta y  $V_T$  es el volumen del polvo ya compactado.

$$(5) \rho_B = \frac{m}{V_C}$$

$$(6) \rho_T = \frac{m}{V_T}$$

### 11.3.9 Propiedades de Fluides

Se emplearon determinaciones de densidad aparente y densidad compacta para el cálculo del índice de Hausner (HR) y el índice de Carr (IC). La compresibilidad de los polvos se evaluó usando el IC que se muestra en la Ec. (7) y la fluidez se evaluó usando la HR que se muestra en la Ec. (8):

$$(7) IC = \left( \frac{\rho_T - \rho_B}{\rho_T} \right) \times 100$$

$$(8) HR = \frac{\rho_T}{\rho_B}$$

Donde  $\rho_T$  y  $\rho_B$  son las densidades compacta y aparente determinadas expresadas en gramos por litro. Los rangos de HR para definir la fluidez son (1)  $1.0 < HR < 1.1$ , polvo de flujo libre; (2)  $1.1 < HR < 1.25$ , polvo de flujo medio; (3)  $1.25 < HR < 1.4$ , polvo de difícil fluidez; y (4)  $HR > 1.4$ , polvo de fluidez muy difícil. Se puede esperar una excelente fluidez del polvo si el IC está entre 0.05 y 0.15, aceptable a un flujo regular cuando el IC está entre 0.15 y 0.24 y una fluidez deficiente cuando el IC es superior a 0.25 (Skibsted et al., 2010).

### 11.3.10 Solubilidad

La solubilidad del polvo se determinó mediante métodos descritos por Cortés-Rojas et al. (2012) Los polvos se disolvieron en agua en una proporción de 1:10 y se mezclaron a 21°C y 700 rpm hasta que se logró la disolución completa. La mezcla resultante se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 4 ° C (SL16R Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Se separó el sobrenadante y se vertieron 20 mL en un plato de aluminio y se colocaron en un horno de secado a 105°C hasta que se evaporó toda el agua. Se registró el peso de los sólidos restantes hasta peso constante. La solubilidad se calculó usando la Ec. (9) donde  $S_O$  es la solubilidad,  $m_{CW}$  es la masa de los sólidos restantes a peso constante,  $m_{AD}$  es la masa del plato de aluminio y  $V_W$  es el volumen de agua utilizado. Los resultados se expresaron en gramos por litro.

$$(9) S_O = \frac{m_{CW} - m_{AD}}{V_W}$$

### 11.3.11 Diseño experimental y análisis estadístico

Todos los experimentos de secado por aspersión se realizaron por triplicado. Los parámetros de procesamiento evaluados para la microencapsulación del extracto de *S. compressa* fueron las relaciones entre temperatura de entrada/temperatura de salida ( $T_1/T_0$ ) y el tipo de acarreador (Ca). Se evaluaron dos  $T_1/T_0$  diferentes 180/90 y 150/75 °C y seis tipos de acarreadores, utilizando 3 portadores puros (MD, HPMC y WP) y tres mezclas (HPMC/MD 50:50, GA/MD 40:60 y HPBCD/MD 50:50). Se utilizó un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey-Krammer. Para evaluar la correlación dentro de las variables de respuesta, se realizó una prueba de Pearson ( $p \leq 0.05$ ). Todos los análisis y pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software JMP 14.

## 11.4 Resultados

### 11.4.1 Recuperación de producto

De acuerdo con el análisis ANOVA ( $R^2_{\text{(ajustada)}} = 96.10\%$ ), la recuperación del producto se vio significativamente afectada por el tipo de acarreador, la relación  $T_1/T_0$  y su interacción ( $p \leq 0.05$ ). La recuperación del producto osciló entre  $60.05 \pm 0.88 \%$  y  $86.01 \pm 0.21\%$  (Tabla 5). La recuperación de producto más elevada fue del 86.01%, obtenida al secar a 180 °C utilizando la mezcla de acarreadores HPMC/MD.

El acarreador puro con mayor recuperación fue WP con 70.46 y 75.58 %, a 150 y 180°C respectivamente. Los acarreadores puros con menor recuperación fueron MD y HPMC, con 60.05% a 150 °C y 67.47% a 180°C, respectivamente. Los experimentos donde se utilizaron mezclas de acarreadores mostraron una mayor recuperación de producto que aquellos experimentos donde se utilizaron acarreadores puros (Tabla 5). La combinación de HPMC/MD aumentó la recuperación de producto (en un factor de 1.55 y 1.20 a 150 °C y 1.24 y 1.30 a 180 °C), en comparación con MD y HPMC. La mezcla MD/GA no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con la mezcla HPMC/MD a la temperatura 180 °C, resultando en los experimentos con mayor rendimiento de producto. La mezcla de acarreadores con menor rendimiento de producto fue MD/HPBCD, pero, no presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al compararla con WP, el acarreador puro con mayor rendimiento en ambas temperaturas evaluadas.

**Tabla 5: Rendimiento de producto**

R T <sub>I</sub> /T <sub>O</sub>	Tipo de acarreador	Rendimiento (g producto seco g <sup>-1</sup> solidos alimentados)
150/75	MD	60.05 ± 0.88 <sup>e</sup>
	HPMC	67.47 ± 0.35 <sup>d</sup>
	WP	70.46 ± 0.36 <sup>cd</sup>
	HPMC/MD	81.08 ± 0.54 <sup>ab</sup>
	MD/GA	72.44 ± 0.36 <sup>cd</sup>
	MD/HPBCD	67.59 ± 0.71 <sup>cd</sup>
180/90	MD	68.85 ± 0.36 <sup>d</sup>
	HPMC	65.90 ± 1.07 <sup>d</sup>
	WP	75.58 ± 1.03 <sup>bc</sup>
	HPMC/MD	86.01 ± 0.21 <sup>a</sup>
	MD/GA	85.27 ± 0.42 <sup>a</sup>
	MD/HPBCD	76.31 ± 1.38 <sup>bc</sup>

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

#### 11.4.2 Contenido de humedad

Los resultados del análisis ANOVA ( $R^2_{(ajustada)}=81.42\%$ ) arrojaron que el tipo de acarreador, la relación T<sub>I</sub> /T<sub>O</sub> y su interacción afectaron significativamente el contenido de humedad en los productos ( $p \leq 0.05$ ). La humedad de los productos osciló entre  $6.24 \pm 0.43\%$  y  $10.80 \pm 0.49\%$  (Tabla 6). El contenido de humedad más bajo fue  $6.24 \pm 0.56\%$  y se obtuvo a 180 ° C utilizando HPMC. El aumento de la temperatura en los experimentos con MD disminuyó el contenido de humedad del producto final. Al contrario de los experimentos de MD, los experimentos con mezcla HPMC /MD mostraron un aumento en el contenido de humedad ( $10.80 \pm 0.49\%$  y  $9.64 \pm 0.33\%$  a 150 y 180 ° C, respectivamente) con respecto a los experimentos puros con HPMC y MD. La prueba de medias de Tukey determinó que los experimentos 150 °C – WP y 180 °C – WP no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ); el mismo comportamiento se presentó con los experimentos realizados con HPMC, MD/GA (Tabla 6). La comparación de medias entre los experimentos WP, MD/GA, MD/HPBCD y HPMC no mostró diferencias significativas.

**Tabla 6: Contenido de humedad de los productos obtenidos**

R T <sub>I</sub> /T <sub>O</sub>	Tipo de acarreador	Contenido de Humedad (g H <sub>2</sub> O removido g <sup>-1</sup> producto)
150/75	MD	9.66 ± 0.15 <sup>ab</sup>
	HPMC	6.76 ± 0.13 <sup>d</sup>
	WP	7.75 ± 0.39 <sup>cd</sup>
	HPMC/MD	10.80 ± 0.49 <sup>a</sup>
	MD/GA	8.30 ± 0.36 <sup>bcd</sup>
	MD/HPBCD	8.06 ± 0.08 <sup>cd</sup>
180/90	MD	7.15 ± 0.16 <sup>d</sup>
	HPMC	6.24 ± 0.43 <sup>d</sup>
	WP	7.84 ± 0.06 <sup>cd</sup>
	HPMC/MD	9.64 ± 0.33 <sup>abc</sup>
	MD/GA	8.13 ± 0.10 <sup>cd</sup>
	MD/HPBCD	7.58 ± 0.33 <sup>cd</sup>

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

### 11.4.3 Higroscopia

La higroscopia del polvo osciló entre  $35.81 \pm 0.71\%$  y  $25.13 \pm 0.72\%$  (Tabla 7). El análisis de varianza ANOVA ( $R^2_{\text{(ajustada)}}=94.42\%$ ) determinó que la relación T<sub>I</sub> /T<sub>O</sub> y el tipo de acarreador y su interacción mostraron un efecto significativo en la higroscopia del polvo ( $p \leq 0.05$ ). El polvo menos higroscópico se obtuvo a 150 °C utilizando WP como acarreador. El polvo más higroscópico se obtuvo a 150°C y 180 ° C usando HPMC. Las mezclas de acarreadores HPMC / MD y MD / GA y MD / HPBCD mostraron un comportamiento diferente, muy similar entre ellas sin aumentar los valores de higroscopia y sin mostrar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7: Higroscopía de los polvos obtenidos**

R T <sub>I</sub> /T <sub>O</sub>	Tipo de acarreador	Contenido de Humedad (g H <sub>2</sub> O removido g <sup>-1</sup> producto)
150/75	MD	31.98 ± 0.15 <sup>bc</sup>
	HPMC	35.81 ± 0.13 <sup>a</sup>
	WP	25.13 ± 0.39 <sup>d</sup>
	HPMC/MD	29.70 ± 0.49 <sup>c</sup>
	MD/GA	30.51 ± 0.36 <sup>c</sup>
	MD/HPBCD	31.70 ± 0.08 <sup>bc</sup>
180/90	MD	33.31 ± 0.16 <sup>ab</sup>
	HPMC	35.17 ± 0.43 <sup>a</sup>
	WP	27.16 ± 0.06 <sup>d</sup>
	HPMC/MD	32.20 ± 0.33 <sup>bc</sup>
	MD/GA	32.16 ± 0.10 <sup>bc</sup>
	MD/HPBCD	32.04 ± 0.33 <sup>bc</sup>

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

#### 11.4.4 Densidad aparente aireada y densidad aparente compactada

La densidad aparente aireada y compactada son importantes ya que influyen en los costos de transporte, las consideraciones de empaque e incluso la densidad de color del producto (Walton, 2000). Las densidades aparentes aireadas variaron de  $112.57 \pm 1.30$  a  $271.49 \pm 8.23$  g L<sup>-1</sup> mientras que las densidades aparentes compactadas variaron de  $165.40 \pm 2.08$  a  $563.19 \pm 13.29$  g L<sup>-1</sup> (Tabla 8).

En este experimento, el análisis de varianza ANOVA ( $R^2_{\text{(ajustada)}} = 99.88\%$  para  $\rho_b$  y  $R^2_{\text{(ajustada)}} = 99.60\%$  para  $\rho_t$ ) determinó que tanto el efecto de la relación T<sub>I</sub>/T<sub>O</sub> como el tipo de acarreador y su interacción fueron significativos sobre la densidad aparente aireada y la densidad aparente compactada de los polvos ( $p \leq 0.05$ ). En todos los experimentos la densidad aparente aireada disminuyó al aumentar la relación T<sub>I</sub>/T<sub>O</sub> (Tabla 8). Las densidades aparentes aireadas más altas se obtuvieron utilizando MD como acarreador:  $367.85 \pm 2.55$  a 150°C y  $273.30 \pm 1.70$  a 180°C. La prueba de comparación de medias de Tukey determinó las marcadas diferencias en los valores de las densidades utilizando los diferentes acarreadores y relación T<sub>I</sub>/T<sub>O</sub> (Tabla 8). De manera general, los experimentos con mezclas de MD vieron reducida su densidad aparente aireada y compacta en ambas relaciones T<sub>I</sub>/T<sub>O</sub> evaluadas.



**Tabla 8: Densidad aparente aireada y compactada de los polvos obtenidos**

R T <sub>i</sub> /T <sub>o</sub>	Tipo de acarreador	Densidad aparente aireada (g producto L <sup>-1</sup> )	Densidad aparente compactada (g producto L <sup>-1</sup> )
150/75	MD	367.85 ± 2.55 <sup>a</sup>	598.14 ± 0.72 <sup>a</sup>
	HPMC	115.32 ± 0.52 <sup>g</sup>	217.64 ± 3.13 <sup>g</sup>
	WP	131.40 ± 0.50 <sup>f</sup>	288.84 ± 4.27 <sup>ef</sup>
	HPMC/MD	158.00 ± 2.00 <sup>e</sup>	306.86 ± 6.86 <sup>e</sup>
	MD/GA	276.42 ± 2.94 <sup>b</sup>	531.66 ± 4.56 <sup>b</sup>
	MD/HPBCD	221.52 ± 2.95 <sup>d</sup>	388.93 ± 8.47 <sup>d</sup>
180/90	MD	273.30 ± 1.70 <sup>b</sup>	581.83 ± 16.00 <sup>a</sup>
	HPMC	75.75 ± 2.05 <sup>h</sup>	151.40 ± 4.20 <sup>h</sup>
	WP	124.07 ± 1.87 <sup>fg</sup>	250.10 ± 2.80 <sup>g</sup>
	HPMC/MD	121.28 ± 1.23 <sup>fg</sup>	252.66 ± 2.55 <sup>fg</sup>
	MD/GA	252.08 ± 2.52 <sup>c</sup>	458.32 ± 4.57 <sup>c</sup>
	MD/HPBCD	211.16 ± 2.40 <sup>d</sup>	403.38 ± 6.74 <sup>d</sup>

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

#### 11.4.5 Propiedades de fluidez

Para los índices de Carr y Haussner el análisis de varianza ANOVA ( $R^2_{(ajustada)} = 90.71\%$  y  $R^2_{(ajustada)} = 90.67\%$ , respectivamente) determinó que tanto el efecto de la relación T<sub>i</sub>/T<sub>o</sub> como el tipo de acarreador y su interacción sobre las densidades aparentes y compacta de los polvos fueron significativos ( $p \leq 0.05$ ).

El Índice de Carr (IC) es una variable que se relaciona con cómo se comprime el polvo después de una manipulación mecánica y es una función de la densidad aparente aireada y la densidad aparente compacta (Cortés-Rojas y Oliveira 2012). Los IC calculados se muestran en la Tabla 9. Los valores estuvieron en los rangos entre  $0.3850 \pm 0.50$  y  $0.5450 \pm 0.50$ , lo que indica una baja fluidez y un alto grado de compresibilidad (Gallo et al. 2011). El índice de Haussner (HR) se relaciona con la fricción entre partículas, los polvos con partículas grandes presentan baja fricción entre las partículas y tienen valores de HR de 1.2, mientras que los polvos que presentan partículas más pequeñas y cohesivas con flujo restringido tienen HR superior a 1.6 (Santhalakshmy et al. 2015). Los valores de HR calculados estuvieron en los rangos entre  $2.20 \pm 0.02$  y  $1.63 \pm 0.01$  indicando que los polvos obtenidos presentan dificultad para fluir (Gallo et al. 2011).

**Tabla 9: Propiedades de fluidez**

R T <sub>I</sub> /T <sub>O</sub>	Tipo de acarreador	Índice de Carr (IC)	Índice Haussner (HR)
150/75	MD	0.39 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.63 ± 0.01 <sup>f</sup>
	HPMC	0.47 ± 0.01 <sup>cde</sup>	1.89 ± 0.04 <sup>cde</sup>
	WP	0.55 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.02 <sup>a</sup>
	HPMC/MD	0.48 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	1.92 ± 0.00 <sup>bcd</sup>
	MD/GA	0.48 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	1.94 ± 0.07 <sup>cde</sup>
	MD/HPBCD	0.43 ± 0.02 <sup>ef</sup>	1.76 ± 0.06 <sup>ef</sup>
180/90	MD	0.53 ± 0.01 <sup>ab</sup>	2.13 ± 0.05 <sup>ab</sup>
	HPMC	0.50 ± 0.00 <sup>abcd</sup>	2.00 ± 0.00 <sup>abcd</sup>
	WP	0.43 ± 0.00 <sup>ef</sup>	1.75 ± 0.00 <sup>ef</sup>
	HPMC/MD	0.45 ± 0.01 <sup>abc</sup>	1.82 ± 0.04 <sup>abc</sup>
	MD/GA	0.52 ± 0.01 <sup>de</sup>	2.08 ± 0.04 <sup>def</sup>
	MD/HPBCD	0.48 ± 0.00 <sup>bcd</sup>	1.91 ± 0.01 <sup>cde</sup>

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

#### 11.4.6 Solubilidad

Los valores de solubilidad obtenidos variaron de  $73.46 \pm 0.93$  a  $89.27 \pm 0.69$  g L<sup>-1</sup> (Tabla 10). El análisis de varianza ANOVA ( $R^2_{\text{(ajustada)}} = 96.43\%$ ) determinó que el tipo de acarreador y su interacción con la relación T<sub>I</sub>/T<sub>O</sub> tuvieron un efecto significativo en la solubilidad de los polvos ( $p \leq 0.05$ ). La mayor solubilidad se obtuvo operando a una temperatura de entrada de 180 °C usando como acarreador HPMC, la menor solubilidad se obtuvo operando a una temperatura de entrada de 180 °C usando MD/HPBCD como acarreador (Tabla 10). La prueba de Tukey no mostró diferencias significativas en la solubilidad entre los promedios de los experimentos secados a 150 °C y 180 °C ( $p > 0.05$ ). La mayor solubilidad para el experimento con MD se obtuvo a una R T<sub>I</sub>/T<sub>O</sub> de 180/90 °C.

**Tabla 10: Solubilidad de los polvos obtenidos**

R T <sub>i</sub> /T <sub>o</sub>	Tipo de acarreador	Solubilidad (g L <sup>-1</sup> )
150/75	MD	87.64 ± 0.40 <sup>ab</sup>
	HPMC	84.69 ± 0.89 <sup>b</sup>
	WP	86.22 ± 0.66 <sup>b</sup>
	HPMC/MD	87.22 ± 0.48 <sup>ab</sup>
	MD/GA	87.97 ± 0.23 <sup>ab</sup>
	MD/HPBCD	79.07 ± 0.06 <sup>c</sup>
180/90	MD	89.24 ± 0.34 <sup>a</sup>
	HPMC	89.27 ± 0.69 <sup>a</sup>
	WP	84.28 ± 0.96 <sup>b</sup>
	HPMC/MD	84.88 ± 0.53 <sup>b</sup>
	MD/GA	86.76 ± 0.04 <sup>ab</sup>
	MD/HPBCD	73.46 ± 0.93 <sup>d</sup>

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas según la prueba de Tukey-Kramer ( $p \leq 0.05$ )

### 11.5 Discusión

Los incrementos en la recuperación del producto al agregar HPMC son similares a los reportados por Youjie Wang et al. (2014) para la microencapsulación de extractos herbales chinos, donde al agregar 24% de HPMC en el alimento, la recuperación del producto se incrementó hasta un 24,78% en comparación con el secado de un alimento que tenía solo 4% de HPMC. Este fenómeno podría estar relacionado con el aumento de la temperatura de transición vítrea que se produce cuando se utiliza HPMC como agente acarreador, reduciendo el estado vítreo y la pegajosidad del producto final (Sharma et al. 2015). Estos resultados contrastan con los reportados por Anwar et al. (2018), donde reportan incrementos en la recuperación del producto en la microencapsulación del extracto acuoso de *Sargassum plagyophyllum* utilizando únicamente MD. Al incrementar la cantidad de MD en la solución alimentada sin mantener una relación de sólidos presentes en el extracto/MD constante, los autores reportaron incrementos de hasta 9.11 veces el rendimiento del extracto acuoso sin MD. Al no mantener la relación de sólidos/acarreador constante, el impacto del acarreador es mayor sobre en las propiedades fisicoquímicas de los polvos recuperados, los resultados de Anwar et al. (2018) respaldan lo publicado por Goula y Adamopoulos (2008) para el SA de pulpa de tomate, donde el incremento del

contenido de MD con respecto al contenido de sólidos maximizó el rendimiento de producción al disminuir la deposición de producto en las paredes del secador.

Se ha reportado que cuando el contenido de humedad alcanza valores inferiores al 7%, la difusión de agua a través de la matriz alimentaria disminuye, lo que reduce el efecto del contenido de humedad sobre las propiedades fisicoquímicas de los polvos, así como también la accesibilidad del oxígeno para pasar por la estructura vesicular (Sun et al. 2018), por lo tanto, los productos obtenidos podrían tener una buena estabilidad durante su vida útil. Los resultados del contenido de humedad contrastan a los reportados para el secado por aspersión de fracciones de *Undaria pinnatifida* para la microencapsulación de fucoxantina; donde el contenido más bajo de humedad fue obtenido utilizando MD; la diferencia entre el bajo contenido de humedad reportado por Sun et al. (2018) y los resultados de este experimento pueden atribuirse a la baja concentración de fucoxantina y el elevado contenido de acarreador utilizador, minimizando el impacto de los sólidos extraídos del alga en el producto final.

La reducción del contenido de humedad en los experimentos de MD al aumentar la relación  $T_I/T_O$  puede estar asociado con el aumento del diferencial de temperatura entre las gotas de la solución alimentada y el aire de secado. Este aumento en la fuerza impulsora de la transferencia de energía entre las gotas y el aire genera menos contenido de humedad en el polvo final (Fazaeli et al. 2012; Daza et al. 2016). Los valores de humedad obtenidos en los experimentos usando MD de nuestro estudio son similares a los valores obtenidos para el SA a una  $T_I = 110^\circ\text{C}$  de extracto acuoso de *Sargassum plagyophyllum*; que oscilaron entre 7.96 y 6.07% (5 – 15 % de MD) (Anwar et al. 2018). Las diferencias en el contenido de humedad entre experimentos con diferentes acarreadores a la misma relación  $T_I/T_O$  pueden deberse al peso molecular del acarreador utilizado y a su capacidad del para ligar y retener moléculas de agua (Goula y Adamopoulos 2008b). De manera general el incremento en la relación  $T_I/T_O$  de 150 a  $180^\circ\text{C}$  disminuyó la humedad de todos los productos obtenidos. Este comportamiento inversamente proporcional entre la relación  $T_I/T_O$  y el contenido de humedad corresponde con lo reportado para el extracto de alga verde *Kappaphycus alvarezii* (Bono et al. 2011), para el extracto colorante del alga parda

*Sargassum muticum* (Norbrillinda et al. 2016) y para otras matrices como jugo de melón (Quek et al. 2007) y jugo de mora negra (Wang et al. 2020).

Los polvos donde se utilizó MD como único vehículo, mostraron un aumento en la higroscopia a medida que aumentaba la relación  $T_I / T_O$ , lo que se relaciona con el contenido de humedad presente en el polvo (Tabla 6). El bajo contenido de humedad resultó en polvos con valores de higroscopia más altos, debido al gradiente de concentración de agua entre el producto y el aire circundante (Tonon et al., 2011). Los productos obtenidos también pueden presentar una elevada higroscopía debido al carácter higroscópico y propiedades gelificantes del alginato o ácido algínico presente en el EXT (Norbrillinda et al. 2016), el cual al estar formado por ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ácido mannurónico y ácido gulurónico) que presentan grupos hidrofílicos que tienden absorber mayor humedad del ambiente (Cano-Chauca et al. 2005). Este comportamiento también se reporta para el extracto colorante de *Sargassum muticum* (Norbrillinda et al. 2016) y en otras matrices como un extracto de polifenoles de uva (Tolun et al., 2016). Cuando se utilizó HPMC como único portador, los valores de higroscopia no se modificaron a medida que la relación  $T_I / T_O$  aumentó de 150 a 180 ° C. Esto podría explicarse con la reducción en la fuerza impulsora de la transferencia de masa de agua entre el polvo y el aire de secado debido al contenido de humedad de los polvos de HPMC (Tonon et al. 2011; Daza et al. 2016) y a las propiedades de retención de agua relacionadas con los grupos hidroxilo presentes en la molécula de HPMC (Sharma et al. 2015).

Los valores obtenidos en las densidades de los productos son menores a los reportados por Norbrillinda et al. (2016) y Cuong (2020) para el SA del extracto colorante de *Sargassum muticum* y el extracto antioxidante de *Sargassum serratum* respectivamente. Las diferencias entre las densidades obtenidas en este estudio y los extractos previamente mencionados pueden deberse a 1) las propiedades fisicoquímicas de los extractos realizados (extracto acuoso y extracto etanólico) y 2) el tipo de acarreadores utilizados y su concentración en la solución alimentada. Un comportamiento similar en las densidades de los productos fue publicado por Bhusari et al. (2014) y Fazaeli et al. (2012) para el secado por atomización de pulpa de tamarindo y jugo de morera negra. La operación a temperaturas de entrada más elevadas acelera la tasa de evaporación, lo que permite que

los polvos se seque a una estructura más porosa, lo que implica una menor contracción de las gotas y se traduce en una menor densidad del producto (Walton 2000; Fazaeli et al. 2012). Los tamaños de partícula más grandes implican densidades aparentes más bajas y pueden generarse secando a altas temperaturas de entrada (Walton, 2000) y aumentando la viscosidad de la solución de alimentación utilizando vehículos de alto peso molecular (Bhusari et al. 2014). La disminución de la densidad en las mezclas de secadas con MD puede deberse a la menor densidad de las gomas y el HPMC; algunos autores han informado disminución las densidades aparentes de mezclas de gomas y MD debido a las densidades de los acarreadores puros. Los materiales portadores más pesados se adaptan más fácilmente a espacios inter-partícula lo que aumenta la densidad aparente del producto final, si disminuye la cantidad de acarreador pesado disminuye la densidad de la mezcla (Ferrari et al. 2012).

Las densidades aparente aireada y aparente compacta resultaron en una correlación positiva no significativa ( $p = 0.196$ ) con el contenido de humedad, varios autores reportan una correlación positiva entre la densidad aparente y el contenido de humedad, en este estudio la correlación positiva podría atribuirse al mayor contenido de humedad obtenido al secar a bajas temperaturas de entrada ( $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Esto debido a que la humedad residual por la incompleta la eliminación del agua dentro de la cámara del secador genera partículas más densas (Krishnaiah et al. 2012). El HR y el IC obtenidos estuvieron de acuerdo con los informes para el secado por aspersión de pulpa de tamarindo (Bhusari et al. 2014) y jugo de caña de azúcar (Nishad et al. 2017). Las partículas obtenidas por secado por atomización tienden a presentar partículas pequeñas con escasa fluidez y alto grado de compresión. Su uso en formulaciones nutraceuticas generalmente se asocia con acondicionadores de flujo como sílice y silicatos (Cortés-Rojas y Oliveira, 2012).

Los resultados de solubilidad obtenidos en la mayoría de los productos pueden considerarse elevados (mayores a  $85\text{ g L}^{-1}$ ) (Norbrillinda et al. 2016). Los resultados fueron similares a los reportados en para el extracto colorante de alga parda *Sargassum muticum* (Norbrillinda et al. 2016) y por Santhalakshmy et al. (2015) para jugo de jamun secado por aspersión y por Goula y Adamopoulos (2008a) para el secado por aspersión de pulpa de tomate. El aumento en la solubilidad al incrementar la  $R\ T_I/T_O$  puede deberse al bajo

contenido de humedad de los productos resultantes al operar a 180/90 °C, acarreadores derivados del almidón como MD y HPBCD tienden a generar productos bajos en humedad con incrementos en su solubilidad (Walton 2000; Fazaeli et al. 2012). Por otra parte, el aumento en la solubilidad de los experimentos donde se utilizó MD también puede estar relacionado con un aumento en el tamaño de las partículas (relacionado con la densidad aparente elevada), lo que les permite hundirse, lo que las hace más adecuadas para su humedecimiento y reconstitución (Goula y Adamopoulos 2008b; Goula y Adamopoulos 2008a).

## 12.CONCLUSIONES

En este estudio, la EAU demostró ser efectiva para obtener un extracto rico en PT y PS de *S. compressa*. Los rendimientos de extracción obtenidos para el extracto (sólidos totales), PT y PS fueron 0.5572 g EXT g as<sup>-1</sup>, 7.73 mg PGE g as<sup>-1</sup> y 0.2207 g PS g as<sup>-1</sup> respectivamente con los parámetros de extracción optimizados [ temperatura (50 ° C), densidad de potencia (3,8 W cL<sup>-1</sup>), relación disolvente / alga marina (30 ml g as<sup>-1</sup>) y concentración de etanol (32.33%)]. No hubo diferencias significativas entre los modelos estadísticos obtenidos y los datos experimentales. Este estudio demostró cómo el rendimiento de extracción está altamente correlacionado con la extracción de PS, siendo esta última una de las fracciones más abundantes presentes en las algas de *S. compressa*.

El aumento de florotaninos con la EAU permite aprovechar al máximo las ventajas de esta tecnología. Hoy en día, la extracción de polifenoles puede realizarse a escala piloto e industrial, aumentando los rendimientos de extracción de productos naturales de alto valor comercial para su uso en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética (Martínez y Ossa 2016). Los resultados de este estudio demuestran efectivamente que la EAU puede mejorar y afectar positivamente la extracción de PT de *S. compressa*. La extracción de PT mejorada por medio de EAU valida su uso. La optimización de este proceso es el primer paso hacia la (1) estabilización del extracto y el posterior (2) escalamiento del proceso para el (3) desarrollo de productos bioactivos que contienen altos niveles de PS y PT. Estas son consideraciones importantes dado el creciente mercado de antioxidantes y prebióticos.

El extracto hidroetanólico de alga parda *S. compressa* (EXT) y su fracción de PS promovieron cambios en los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria en la MIH de diez donantes sanos. El tratamiento con EXT aumentó significativamente la producción de AGCC en comparación con el tratamiento con PS, pero ligeramente menos que el tratamiento con INU. Las diferencias en la síntesis de AGCC y las poblaciones bacterianas entre EXT y PS se debieron a las interacciones de los florotaninos y manitol con la MIH durante las primeras 8 horas de fermentación. No solo los polisacáridos de *S. compressa* fueron relevantes para el mantenimiento y la mejora de una MIH saludable, ya que la actividad metabólica fue influenciada positivamente por los florotaninos y el



manitol. Sin embargo, se necesita más trabajo para confirmar que este efecto prebiótico potencial y sus beneficios para la salud asociados ocurran *in vivo*.

La implementación de la tecnología de ME-SA permitió resolver los problemas de manejo y estabilidad del extracto reduciendo la pegajosidad y contenido de humedad. La ME-SA permitió obtener elevados rendimientos de producto a elevadas  $R_{T_I/T_O}$  utilizando HPMC/MD y MD/GA. Las propiedades fisicoquímicas y las propiedades de fluidez resultantes muestran que los polvos obtenidos tienen las características necesarias para considerarse fisicoquímicamente estables como ingredientes activos para una formulación de carácter nutraceútica (bajo contenido de humedad, alto rendimiento de proceso y elevada solubilidad). Se necesitan estudios sucesivos para determinar la retención de los activos presentes en el EXT y las probables interacciones con los acarreadores propuestos, además de comprobar la bioactividad de los productos obtenidos.

### **13.PERSPECTIVAS**

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones.

En un primer plano estarían los trabajos enfocados a completar los aspectos de caracterización de los productos obtenidos mediante secado por aspersión. Se podría determinar la retención de florotaninos y polisacáridos en los polvos obtenidos. La opción más plausible sería realizar una extracción con el solvente óptimo, remover los excipientes utilizando una operación de ultrafiltración. Se podría estudiar también el efecto prebiótico del producto con mayor retención de compuestos bioactivos.

Sería interesante realizar el estudio del comportamiento de la microbiota intestinal de pacientes diabéticos. Determinar si el contenido de florotaninos y polisacáridos del extracto optimizado permite modular y cambiar o restablecer los niveles normales de una microbiota afectada por una enfermedad crónica como diabetes.

Otro punto que sería interesante complementar es la caracterización de la fracción de polisacáridos. Determinar si los polisacáridos obtenidos son derivados del alginato, fucoidan o laminaran y estudiar el efecto de la extracción asistida con ultrasonido en la estructura de estos polisacáridos.

## 14.ANEXOS

### 14.1 Portada Artículo: “Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae)”

Journal of Applied Phycology  
https://doi.org/10.1007/s10811-019-02013-2



#### Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae)

Benjamín Vázquez-Rodríguez<sup>1</sup> · Janet A. Gutiérrez-Urbe<sup>2</sup> · Marilena Antunes-Ricardo<sup>2</sup> · Liliana Santos-Zea<sup>2</sup> · Lucia Elizabeth Cruz-Suárez<sup>1</sup>

Received: 2 July 2019 / Revised and accepted: 3 December 2019  
© Springer Nature B.V. 2020

#### Abstract

*Silvetia compressa* is a brown seaweed native to the coast of Baja California, Mexico. It is a rich source of phlorotannins and polysaccharides, two compound families with important nutraceutical applications. Optimal conditions for obtaining highly concentrated phlorotannin and polysaccharide extracts from *S. compressa* were determined using Box-Behnken experimental design combined with response surface methodology (RSM). The effect of extraction temperature ( $X_1$ : 50–65 °C), ultrasound power density ( $X_2$ : 1.2–3.8 W cL<sup>-1</sup>), solvent/seaweed ratio ( $X_3$ : 10–30 mL g<sup>-1</sup> seaweed meal), and ethanol concentration ( $X_4$ : 25–100% ethanol in water) on phlorotannin and polysaccharide yield was explored. Experimental results were fitted to a second-degree polynomial model, while model fitness was assessed using analysis of variance (ANOVA). From this analysis, optimal phlorotannin and polysaccharide extraction conditions were determined for the evaluated parameters ( $X_1 = 50$  °C,  $X_2 = 3.8$  W cL<sup>-1</sup>,  $X_3 = 30$  mL g<sup>-1</sup> seaweed meal, and  $X_4 = 32.33\%$ ). Under these conditions, experimental phlorotannin and polysaccharide yields were 0.73% and 23% (w/w), respectively. Phlorotannin extraction was significantly enhanced by ultrasound power density, while polysaccharide extraction improved when using low ethanol concentration in the solvent, therefore both families of compounds were obtained combining those parameters. Experimental data agreed with predictions from the RSM model, indicating suitability of the obtained model and the success of RSM in optimizing the extraction conditions. In addition, the identification of the main compounds in the phlorotannin extract was carried out by HPLC-MS-TOF; 8 of the 12 identified phenolic compounds belonged to the phlorotannin family, 4 from the fuhanol group, 3 being eckol derivatives, and 1 being a phloroglucinol subunit.

**Keywords** Brown seaweed · Phaeophyceae · Phenolic compounds · Phytochemical recovery · Response surface methodology

#### Introduction

In the last 20 years, seaweeds have become a common source of phytochemicals (Plaza and Iba 2008; Samarakoon and Jeon 2012; Rebours et al. 2014). Several marine brown algae extracts from different species are used as food and additives in cosmetic and food industries (Hifney et al. 2016). Advances in phytochemistry have identified various marine brown algae genera (e.g., *Eisenia*, *Cystoseira*, *Macrocystis*, *Sargassum*, *Laminaria*, and *Ascophyllum*) as potential sources of chemical compounds with nutraceutical, pharmaceutical, prebiotic, and cosmetic applications (Balboa et al. 2013). The nutraceutical effect of brown algae is primarily due to two families of chemical compounds: phlorotannins (PT) and polysaccharides (PS). Extracted fractions containing phlorotannin and PS, separated or in mixture, have shown hypoglycemic, hypolipidemic, anticancer, antiviral, antibacterial, bacteriostatic (Bogolitsyn et al. 2019), antioxidant (Wijesekara et al. 2011; Gil-Chavez et al.

✉ Janet A. Gutiérrez-Urbe  
jagu@tec.mx

✉ Lucia Elizabeth Cruz-Suárez  
lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Benjamín Vázquez-Rodríguez  
bnjmnvzqzrdrgz@gmail.com

Marilena Antunes-Ricardo  
marilena.antunes@tec.mx

Liliana Santos-Zea  
lilianasantos@tec.mx

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Universidad SN, Cd. Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

<sup>2</sup> Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Centro de Biotecnología-FEMSA, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, 64849 Monterrey, NL, Mexico

## 14.2 Portada Artículo: “Effects of phlorotannin and polysaccharide fractions of brown seaweed *Silvetia compressa* on human gut microbiota composition using an in vitro colonic model.

Journal of Functional Foods 84 (2021) 104596



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)



### Effects of phlorotannin and polysaccharide fractions of brown seaweed *Silvetia compressa* on human gut microbiota composition using an *in vitro* colonic model

Benjamín Vázquez-Rodríguez<sup>a</sup>, Liliana Santos-Zea<sup>b</sup>, Erick Heredia-Olea<sup>b</sup>,  
Laura Acevedo-Pacheco<sup>b</sup>, Arlette Santacruz<sup>b</sup>, Janet A. Gutiérrez-Urbe<sup>b,\*</sup>,  
Lucía Elizabeth Cruz-Suárez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas Unidad B, Ave. Universidad SN, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León C.P. 66455, Mexico

<sup>b</sup> Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Centro de Biotecnología-FEMSA, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Monterrey, Nuevo León C.P. 64849, Mexico

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Prebiotic effect  
Short-chain fatty acids  
Phenolic compounds  
Microbiota  
Dietary Fiber

#### ABSTRACT

Few studies had demonstrated the interaction of phlorotannins and polysaccharides from algae on microbial diversity and growth of probiotic bacteria on the early stages of colonic fermentation. *Silvetia compressa* hydroethanolic extract rich in phlorotannins and its isolated polysaccharides fraction enabled the proliferation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and increased total short-chain fatty acids synthesis compared to a negative control. Eckstolonol, dieckol and acacetin derivative in hydroethanolic extract were depleted after eight hours of *in vitro* colonic fermentation. After a 48 h fermentation, hydroethanolic extract showed high levels of acetic (104.82  $\mu\text{mol g}^{-1}$  wet feces) and propionic acids (78.58  $\mu\text{mol g}^{-1}$  wet feces), as well as an increase in *Bifidobacterium* ( $\log_{10}$  6.77 CFU  $\text{g}^{-1}$  wet feces) and *Lactobacillus* ( $\log_{10}$  4.25 CFU  $\text{g}^{-1}$  wet feces) growth. These results showed no significant difference with inulin ( $p > 0.05$ ), suggesting the potential of *Silvetia compressa* hydroethanolic extract to improve human gut microbiota.

#### 1. Introduction

The interaction between phenolic compounds and human gut microbiota (HGM) has gained scientific momentum due to its wide range of physiological functions involving metabolic and enzymatic activities that support digestive health (Espín, González-Sarriás, & Tomás-Barberán, 2017). The HGM protects the host against gastrointestinal pathogens (Vogt, Peña-Díaz, & Finlay, 2015), aids in nutrient processing (van Eunen et al., 2013) and modulates the intestine's immune response (Fernández et al., 2016). Disorders in HGM populations have also been linked to various serious chronic diseases, such as type 2 diabetes, obesity, and colon cancer (Fu et al., 2018).

Studies of the HGM have given rise to the concept of prebiotics. These are defined as non-digestible food components that are fermented preferentially by HGM and selectively stimulate the growth and/or activity of the intestinal microbes leading to health benefits of the host

(Charoensiddhi, Conlon, Franco, & Zhang, 2017; Okolie, Mason, Mohan, Pitts, & Udenigwe, 2019). The development of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* is considered as a traditional sign of prebiotic (Charoensiddhi et al., 2017; Kleerebezem & Vaughan, 2009). The wide array of gastrointestinal diseases has paved the way for the development of a prebiotic market, which had an estimated 3.4 billion USD value by the year 2018 and it is expected to reach 8.34 billion by 2026 (Reports and Data, 2019). Thus, research focused on the development of effective prebiotics can have great scientific and economic impact.

*Silvetia* genus belongs to the Fucales family (Fucaceae, Phaeophyceae); it is used as a food ingredient in Asian countries (Pereira, 2016), as well as for bioremediation (Girardi et al., 2014). *Silvetia compressa* (J. Agardh; E. Serrão, T.O. Cho, S.M. Boo & Brawley), previously known as *Pelvetia fastigiata* (J. Agardh; De Toni), is a common member of the upper intertidal fucoid community in the Pacific coast of North America from Humboldt County, California, to Punta Baja, Baja California, Mexico,

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [lilianasantos@tec.mx](mailto:lilianasantos@tec.mx) (L. Santos-Zea), [erickho@tec.mx](mailto:erickho@tec.mx) (E. Heredia-Olea), [asantacruz@tec.mx](mailto:asantacruz@tec.mx) (A. Santacruz), [jagu@tec.mx](mailto:jagu@tec.mx) (J.A. Gutiérrez-Urbe), [lucia.cruzsr@uanl.edu.mx](mailto:lucia.cruzsr@uanl.edu.mx) (L.E. Cruz-Suárez).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104596>

Received 15 January 2021; Received in revised form 9 June 2021; Accepted 18 June 2021

Available online 26 June 2021

1756-4646/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## 15.BIBLIOGRAFIA

- Acevedo-Pacheco L, Muzquiz de la Garza AR, Palacios-Mechetnov E, Gutiérrez-Urbe JA, Trejo-Chávez A, Cruz-Suárez LE, Serna-Saldívar SO. 2020. Effects of *Ecklonia arborea* or *Silvetia compressa* algae intake on serum lipids and hepatic fat accumulation in Wistar rats fed hyperlipidic diets. *Algal Research* 49:101946. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101946>
- Adhikari B, Howes T, Bhandari BR, Troung V. 2004. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. *Journal of Food Engineering* 62:53–68. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00171-7)
- Agregán R, Munekata PES, Franco D, Dominguez R, Carballo J, Lorenzo JM. 2017. Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International* 99:979–985. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.043>
- Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas L, Mateo-Cid L, Mendoza-González A, Krauss-Cosio H. 2002. *Hesperophycus* y *Silvetia* representantes de la familia *Fucaceae* (*Fucales*, *Phaeophyta*) en la costa del Pacífico de México. *Hidrobiología* 12:147–156
- Ahn G, Hwang I, Park E, Kim J, Jeon YJ, Lee J, Park JW, Jee Y. 2008. Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. *Marine Biotechnology* 10:278–289. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9062-9>
- Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. 2011. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs* 9:2106–2130. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
- Alemañ AE, Robledo D, Hayashi L. 2019. Development of seaweed cultivation in Latin America: current trends and future prospects. *Phycologia* 58:462–471. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1640996>
- Ameri M, Maa Y-F. 2007. Spray drying of biopharmaceuticals : Stability and process considerations. *Drying Technology* 24:763–768. <https://doi.org/10.1080/03602550600685275>
- Anwar E, Yulianti DAR, Putri KSS. 2018. Stability of microsphere or *Sargassum plagyophyllum* (Mertens) J. G Agardh extract produced by spray drying using maltodextrin. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 10:376–380
- Assadpour E, Jafari SM. 2019. Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients : From Microcapsules to Nanocapsules. *Annual Review of Food Science and Technology* 10:103–131. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121641>

- Balboa EM, Conde E, Moure A, Falqué E, Domínguez H. 2013. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. Food Chemistry 138:1764–1785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.026>
- Baxter NT, Schmidt AW, Venkataraman A, Kim KS, Waldron C, Schmidt TM. 2019. Dynamics of human gut microbiota and short-chain fatty acids in response to dietary interventions with three fermentable fibers. American Society for Microbiology 10:e02566-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.02566-18>
- Bazzocco S, Mattila I, Guyot S, Renard CMGC, Aura AM. 2008. Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. European Journal of Nutrition 47:442–452. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0747-2>
- Bhandari BR, Datta N, Howes T. 1997. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. Drying Technology 15:671–684. <https://doi.org/10.1080/07373939708917253>
- Bhusari SN, Muzaffar K, Kumar P. 2014a. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. Powder Technology 266:354–364. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.06.038>
- Bhusari SN, Muzaffar K, Kumar P. 2014b. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. Powder Technology 266:354–364. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.06.038>
- Bialonska D, Ramnani P, Kasimsetty SG, Muntha KR, Gibson GR, Ferreira D. 2010. The influence of pomegranate by-product and punicalagins on selected groups of human intestinal microbiota. International Journal of Food Microbiology 140:175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.038>
- Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. 2018. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. Digestive and Liver Disease 50:421–428. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.02.012>
- Blatchford PA, Parkar SG, Hopkins W, Ingram JR, Sutton KH. 2019. Dose-dependent alterations to *in vitro* human microbiota composition and butyrate inhibition by a supercritical carbon dioxide hops extract. Biomolecules 9:390. <https://doi.org/10.3390/biom9090390>
- Bono A, Farm YY, Yasir S, Arifin B, Jasni MN. 2011. Production of Fresh Seaweed Powder using Spraying Technique. Journal of Applied Sciences 11:2340–2345
- Borba D De, Paes L, Kato N, Pessoa A, Durães L. 2019. Marine prebiotics : Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. Food Chemistry 280:175–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.023>

- Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M, Velić D. 2007. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81:236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>
- Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos a. M, Cal-Vidal J. 2005. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6:420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Caporaso JG, L Lauber C, K Costello E, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N, Gordon JI, Knight R. 2011. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology* R50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50>
- Carrera C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG. 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta* 732:100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- Charoensiddhi S, Conlon MA, Franco CMM, Zhang W. 2017a. The development of seaweed-derived bioactive compounds for use as prebiotics and nutraceuticals using enzyme technologies. *Trends in Food Science & Technology* 70:20–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.002>
- Charoensiddhi S, Conlon MA, Vuaran MS, Franco CMM, Zhang W. 2017b. Polysaccharide and phlorotannin-enriched extracts of the brown seaweed *Ecklonia radiata* influence human gut microbiota and fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 29:2407–2416. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1146-y>
- Charoensiddhi S, Conlon MA, Vuaran MS, Franco CMM, Zhang W. 2016. Impact of extraction processes on prebiotic potential of the brown seaweed *Ecklonia radiata* by *in vitro* human gut bacteria fermentation. *Journal of Functional Foods* 24:221–230. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.016>
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34:540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chew KK, Khoo MZ, Ng SY, Thoo YY, Wan Aida WM, Ho CW. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal* 18:1427–1435
- Cho HM, Doan TP, Quy Ha TK, Kim HW, Lee BW, Tung Pham HT, Cho TO, Oh WK. 2019. Dereplication by high-performance liquid chromatography (HPLC) with quadrupole-time-of-flight mass spectroscopy (qTOF-MS) and antiviral activities of

- phlorotannins from *Ecklonia cava*. *Marine Drugs* 17:1–18. <https://doi.org/10.3390/md17030149>
- Christensen KL, Pedersen GP, Kristensen HG. 2001. Preparation of redispersible dry emulsions by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics* 212:187–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00596-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00596-2)
- Cires MJ, Navarrete P, Pastene E, Carrasco-Pozo C, Valenzuela R, Medina DA, Andriamihaja M, Beaumont M, Blachier F, Gotteland M. 2019. Effect of a proanthocyanidin-rich polyphenol extract from avocado on the production of amino acid-derived bacterial metabolites and the microbiota composition in rats fed a high-protein diet. *Food and Function* 10:4022–4035. <https://doi.org/10.1039/c9fo00700h>
- Corona G, Coman MM, Guo Y, Hotchkiss S, Gill C, Yaqoob P, Spencer JPE, Rowland I. 2017. Effect of simulated gastrointestinal digestion and fermentation on polyphenolic content and bioactivity of brown seaweed phlorotannin-rich extracts. *Molecular Nutrition & Food Research* 1700223. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700223>
- Corona G, Ji Y, Anegboonlap P, Hotchkiss S, Gill C, Yaqoob P, Spencer JPE, Rowland I. 2016. Gastrointestinal modifications and bioavailability of brown seaweed phlorotannins and effects on inflammatory markers. *British Journal of Nutrition* 1240–1253. <https://doi.org/10.1017/S0007114516000210>
- Cortés-Martín A, Selma MV, Tomás-Barberán FA, González-Sarriás A, Espín JC. 2020. Where to look into the puzzle of polyphenols and health? The postbiotics and gut microbiota associated with human metatotypes. *Molecular Nutrition and Food Research* 64:1900952. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900952>
- Cuong DX. 2020. Antioxidant Nano Phlorotannin Powder from Brown Algae *Sargassum serratum*: Spray Drying, Antioxidant Activities, Physic-Chemical Characterization. *Journal of Pharmaceutical Research International* 32:71–85. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i930484>
- Da Rosa CG, Borges CD, Zambiasi RC, Rutz JK, da Luz SR, Krumreich FD, Benvenuti EV, Nunes MR. 2014. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT - Food Science and Technology* 58:527–533. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.042>
- Dang TT, Van Vuong Q, Schreider MJ, Bowyer MC, Van Altena IA, Scarlett CJ. 2017. Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology* 29:3161–3173. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1162-y>
- Davila AM, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti PH, Sanz Y, Tomé D. 2013. Re-print of “intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota



- and consequences for the host.” *Pharmacological Research* 69:114–126. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.003>
- Daza LD, Fujita A, Fávaro-Trindade CS, Rodrigues-Ract JN, Granato D, Genovese MI. 2016. Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. *Food and Bioproducts Processing* 97:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.10.001>
- De Vuyst L, Leroy F. 2011. Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *International Journal of Food Microbiology* 149:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.003>
- Duan M, Sun X, Ma N, Liu Y, Luo T, Song S, Ai C. 2019. Polysaccharides from *Laminaria japonica* alleviated metabolic syndrome in BALB/c mice by normalizing the gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules* 121:996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.087>
- Eom SH, Kim YM, Kim SK. 2012. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology* 50:3251–3255. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.028>
- Ermakova S, Men'shova R, Vishchuk O, Kim SM, Um BH, Isakov V, Zvyagintseva T. 2013. Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity. *Algal Research* 2:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.10.002>
- Ersus S, Yurdagel U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80:805–812. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009>
- Espín JC, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA. 2017. The gut microbiota : A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochemical Pharmacology* 139:82–93. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033>
- Fang Z, Bhandari B. 2011. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry* 129:1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.093>
- Fazaeli M, Emam-Djomeh Z, Kalbasi Ashtari A, Omid M. 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioproducts Processing* 90:667–675. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.006>
- Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. 2016. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. *Journal of Functional Foods* 25:511–522. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.032>

- Ferreira SLC, Silva Junior MM, Felix CSA, da Silva DLF, Santos AS, Santos Neto JH, de Souza CT, Cruz Junior RA, Souza AS. 2019. Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. *Food Chemistry* 273:3–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.114>
- Fisch KM, Böhm V, Wright AD, König GM. 2003. Antioxidative meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira crinita*. *Journal of Natural Products* 66:968–975. <https://doi.org/10.1021/np030082f>
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes* 3:289–306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- Foley SA, Mulloy B, Tuohy MG. 2011. An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: Extraction, characterization, and apoptotic effects in vitro. *Journal of Natural Products* 74:1851–1861. <https://doi.org/10.1021/np200124m>
- Fu X, Cao C, Ren B, Zhang B, Huang Q, Li C. 2018. Structural characterization and *in vitro* fermentation of a novel polysaccharide from *Sargassum thunbergii* and its impact on gut microbiota. *Carbohydrate Polymers* 183:230–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.048>
- Gall EA, Lelchat F, Hupel M, Jégou C, Stiger-Pouvreau V. 2015. Extraction and Purification of Phlorotannins from Brown Algae. In: *Natural Products From Marine Algae Methods and Protocols*. pp 131–143
- García-Ríos V, Ríos-Leal E, Robledo D, Freile-Pelegrin Y. 2012. Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycological Research* 60:305–315. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00661.x>
- Garcia-Vaquero M, Rajauria G, O'Doherty J v., Sweeney T. 2017. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Research International* 99:1011–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.016>
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40:1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 14:491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gil-Chavez GJ, Villa AJ, Ayala-Zavala JF, Heredia JB, Sepulveda D, Yahia EM, Gonzalez-Aguilar GA. 2013. Technologies for extraction and production of bioactive

- compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12:5–23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- Girardi F, Hackbarth F V., de Souza SM a GU, de Souza AAU, Boaventura R a R, Vilar VJP. 2014. Marine macroalgae *Pelvetia canaliculata* (Linnaeus) as natural cation exchanger for metal ions separation: A case study on copper and zinc ions removal. *Chemical Engineering Journal* 247:320–329. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.007>
- Gomez-Zavaglia A, Prieto Lage MA, Jimenez-Lopez C, Mejuto JC, Simal-Gandara J. 2019. The potential of seaweeds as a source of functional ingredients of prebiotic and antioxidant value. *Antioxidants* 8
- Gonçalves-Fernández C, Sineiro J, Moreira R, Gualillo O. 2019. Extraction and characterization of phlorotannin-enriched fractions from the Atlantic seaweed *Bifurcaria bifurcata* and evaluation of their cytotoxic activity in murine cell line. *Journal of Applied Phycology* 31:2573–2583. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1729-2>
- Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-ferre P, Mira A. 2012. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One* 7:e29973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029973>
- Gorham JB, Kang S, Williams BA, Grant LJ, McSweeney CS, Gidley MJ, Mikkelsen D. 2017. Addition of arabinoxylan and mixed linkage glucans in porcine diets affects the large intestinal bacterial populations. *European Journal of Nutrition* 56:2193–2206. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1263-4>
- Gotteland M, Riveros K, Gasaly N, Carcamo C, Magne F, Liabeuf G, Beattie A, Rosenfeld S. 2020. The pros and cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Frontiers in Nutrition* 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00163>
- Gouin S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15:330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Goula AM. 2012. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering* 117:492–498. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009>
- Goula AM, Adamopoulos KG. 2008a. Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II . Powder properties. *Drying Technology* 26:726–737. <https://doi.org/10.1080/07373930802046377>
- Goula AM, Adamopoulos KG. 2008b. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: I. Drying Kinetics and Product

- Gowd V, Karim N, Shishir MRI, Xie L, Chen W. 2019. Dietary polyphenols to combat the metabolic diseases via altering gut microbiota. *Trends in Food Science and Technology* 93:81–93. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.005>
- Grosso C, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Valentão P, Sampaio M, Lima J, Andrade PB. 2014. Box – Behnken factorial design to obtain a phenolic-rich extract from the aerial parts of *Chelidonium majus* L. *Talanta* 130:128–136. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.043>
- Grosso C, Valentao P, Ferreres F, B. Andrade P. 2015. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs* 13:3182–3230. <https://doi.org/10.3390/md13053182>
- Hahn T, Lang S, Ulber R, Muffler K. 2012. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry* 47:1691–1698. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.016>
- Han D, Zhu T, Row KH. 2011. Ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Laminaria japonica* Aresch using ionic liquid as extraction solvent. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 32:2212–2216. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.7.2212>
- Han R, Pang D, Wen L, You L, Huang R, Kulikouskaya V. 2019. *In vitro* digestibility and prebiotic activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. *Journal of Functional Foods* 64:103652. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103652>
- He Z, Chen Y, Chen Y, Liu H, Yuan G, Fan Y, Chen K. 2013. Optimization of the microwave-assisted extraction of phlorotannins from *Saccharina japonica* Aresch and evaluation of the inhibitory effects of phlorotannin-containing extracts on HepG2 cancer cells. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 31:1045–1054. <https://doi.org/10.1007/s00343-013-2321-x>
- Hernández-Garibay E, Zertuche-González JA, Pacheco-Ruiz I. 2019. Sulfated polysaccharides (fucoidan) from the brown seaweed *Silvetia compressa* (J. Agardh) E. Serrão, T.O. Cho, S.M. Boo & Brawley. *Journal of Applied Phycology* 31:3841–3847. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01870-1>
- Herrero M, Sánchez-Camargo AP, Cifuentes A, Ibáñez E. 2015. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 71:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>
- Hifney AF, Fawzy MA, Abdel-gawad KM, Gomaa M. 2016. Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum sp.* and its potential antioxidant and emulsifying

- Huang C-Y, Wu S-J, Yang W-N, Kuan A-W, Chen C-Y. 2016a. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. Food Chemistry 197:1121–1129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.100>
- Huang J, Chen L, Xue B, Liu Q, Ou S, Wang Y, Peng X. 2016b. Different flavonoids can shape unique gut microbiota profile *in vitro*. Journal of Food science 81:H2273–H2279. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13411>
- Ikeyama N, Murakami T, Toyoda A, Mori H, Iino T, Ohkuma M, Sakamoto M. 2020. Microbial interaction between the succinate-utilizing bacterium *Phascolarctobacterium faecium* and the gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. Microbiology Open 9:e1111. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1111>
- Imarc Group. 2021. Seaweed Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2021–2026. In: Imarc Group
- Iwai K. 2008. Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-Ay Mice. Plant Foods for Human Nutrition 63:163–169. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0098-4>
- Janiszewska E. 2014. Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. Powder Technology 264:190–196. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.032>
- Jian C, Luukkonen P, Yki-Järvinen H, Salonen A, Korpela K. 2020. Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. PLoS One 15:e0227285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227285>
- Kadam SU, Álvarez C, Tiwari BK, O'Donnell CP. 2015a. Extraction of biomolecules from seaweeds. In: Brijesh K. T, Declan J. T (eds) Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications, first ed. Academic Press, pp 243–269
- Kadam SU, Tiwari BK, O'Connell S, O'Donnell CP. 2015b. Effect of ultrasound pretreatment on the extraction kinetics of bioactives from brown seaweed (*Ascophyllum nodosum*). Separation Science and Technology 50:670–675. <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.960050>
- Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP. 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:4667–4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>
- Kadam SU, Tiwari BK, Smyth TJ, O'Donnell CP. 2015c. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry 23:308–316. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007>

- Kageyama A, Benno Y. 2000. *Catenibacterium mitsuokai* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive anaerobic bacterium isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1595–1599. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1595>
- Kim SM, Kang SW, Jeon JS, Jung YJ, Kim WR, Kim CY, Um BH. 2013. Determination of major phlorotannins in *Eisenia bicyclis* using hydrophilic interaction chromatography: Seasonal variation and extraction characteristics. *Food Chemistry* 138:2399–2406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.057>
- Kleerebezem M, Vaughan EE. 2009. Probiotic and gut *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* : Molecular approaches to study diversity and activity. *Annual review of Microbiology* 63:269–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073341>
- Koga CC. 2015. Stabilization of resveratrol through microencapsulation and Incorporation into Food Products. University of Illinois
- Kong Q, Dong S, Gao J, Jiang C. 2016. *In vitro* fermentation of sulfated polysaccharides from *E. proliferans* and *L. japonica* by human fecal microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules* 91:867–871. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.036>
- Kong Q, Zhang R, You L, Ma Y, Liao L, Pedisić S. 2021. *In vitro* fermentation characteristics of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* and its modulation effects on gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology* 151. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112145>
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. 2012. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design* 90:622–632. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2011.09.003>
- Kristek A, Wiese M, Heuer P, Kosik O, Schär MY, Soykan G, Alsharif S, Kuhnle GGC, Walton G, Spencer JPE. 2019. Oat bran, but not its isolated bioactive beta-glucans or polyphenols, have a bifidogenic effect in an *in vitro* fermentation model of the gut microbiota. *British Journal of Nutrition* 121:549–559. <https://doi.org/10.1017/S0007114518003501>
- Kwak H-S. 2014. Overview of Nano- and Microencapsulation for Foods. In: *Nano- and Microencapsulation for Foods*, 1st edn. Wiley-Blackwell, pp 1–12
- Lalegerie F, Gager L, Stiger-Pouvreau V, Connan S. 2020. The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. In: Bourgoignon N (ed) *Seaweeds Around the World: State of Art and Perspectives*, 1st Editio. pp 247–287
- Lama-Muñoz A, Contreras M, Espínola F, Moya M, Romero I, Castro E. 2020. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish

- cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry* 320:126626. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126626>
- Lee SH, Kang MC, Moon SH, Jeon BT, Jeon YJ. 2013. Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. *Algae* 28:371–378. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.4.371>
- Leiro JM, Castro R, Arranz J a., Lamas J. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *International Immunopharmacology* 7:879–888. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.007>
- Lester GE, Lewers KS, Medina MB, Saftner RA. 2012. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis* 27:102–107. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.05.003>
- Leyton A, Pezoa-Conte R, Barriga A, Buschmann AH, Mäki-Arvela P, Mikkola JP, Lienqueo ME. 2016. Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design. *Algal Research* 16:201–208. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.019>
- Leyton A, Pezoa-Conte R, Mäki-Arvela P, Mikkola JP, Lienqueo ME. 2017. Improvement in carbohydrate and phlorotannin extraction from *Macrocystis pyrifera* using carbohydrate active enzyme from marine *Alternaria sp.* as pretreatment. *Journal of Applied Phycology* 29:2039–2048. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1141-3>
- Li M, Li G, Shang Q, Chen X, Liu W, Pi X, Zhu L, Yin Y, Yu G, Wang X. 2016. *In vitro* fermentation of alginate and its derivatives by human gut microbiota. *Anaerobe* 39:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.02.003>
- Li Y, Fu X, Duan D, Liu X, Xu J, Gao X. 2017. Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine Drugs* 15:15–49. <https://doi.org/10.3390/md15020049>
- Liong MT, Shah NP. 2005. Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *Journal of Applied Microbiology* 99:783–793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02677.x>
- Liu M, Hansen PE, Lin X. 2011. Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Marine Drugs* 9:1273–1292. <https://doi.org/10.3390/md9071273>
- Loo YT, Howell K, Chan M, Zhang P, Ng K. 2020. Modulation of the human gut microbiota by phenolics and phenolic fiber-rich foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:1268–1298. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12563>

- Luque de Castro MD, Priego-Capote F. 2007. Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta* 583:2–9. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.039>
- Ma C, Feng M, Zhai X, Hu M, You L, Luo W, Zhao M. 2013. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44:886–894. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.01.032>
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5445–5451. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5445-5451.2002>
- Mayakrishnan V, Kannappan P, Abdullah N, Ahmed ABA. 2013. Cardioprotective activity of polysaccharides derived from marine algae: An overview. *Trends in Food Science and Technology* 30:98–104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.01.007>
- Montero L, Sánchez-Camargo AP, García-Cañas V, Tanniou A, Stiger-Pouvreau V, Russo M, Rastrelli L, Cifuentes A, Herrero M, Ibáñez E. 2016. Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography A* 1428:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.053>
- Morán-Santibañez K, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Robledo D, Freile-Pelegrín Y, Peña-Hernández MA, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila LM. 2016. Synergistic effects of sulfated polysaccharides from Mexican seaweeds against measles virus. *BioMed Research International* 8502123. <https://doi.org/10.1155/2016/8502123>
- Moreira R, Sineiro J, Chenlo F, Arufe S, Díaz-Varela D. 2017. Aqueous extracts of *Ascophyllum nodosum* obtained by ultrasound-assisted extraction: effects of drying temperature of seaweed on the properties of extracts. *Journal of Applied Phycology* 29:3191–3200. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1159-6>
- Moroney NC, O’Grady MN, O’Doherty J V., Kerry JP. 2013. Effect of a brown seaweed (*Laminaria digitata*) extract containing laminarin and fucoidan on the quality and shelf-life of fresh and cooked minced pork patties. *Meat Science* 94:304–311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.02.010>
- Mosele JI, Macià A, Motilva M-J. 2015a. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A review. *Molecules* 20:17429–17468. <https://doi.org/10.3390/molecules200917429>
- Mosele JI, Macià A, Romero MP, Motilva MJ. 2016. Stability and metabolism of Arbutus unedo bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and



- colonic fermentation. Food Chemistry 201:120–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.076>
- Mosele JI, Macià A, Romero MP, Motilva MJ, Rubió L. 2015b. Application of *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation models to pomegranate products (juice, pulp and peel extract) to study the stability and catabolism of phenolic compounds. Journal of Functional Foods 14:529–540. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.026>
- Múzquiz AR, Tapia-Salazar M, Maldonado-Muñiz M, Rosa-Millán J de la, Gutiérrez-Uribe JA, Santos-Zea L, Barba-Dávila BA, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE. 2019. Nutraceutical potential of five mexican brown seaweeds. BioMed Research International Vol 2019:1–15
- Navarro-Flores MJ, Ventura-Canseco LMC, Meza-Gordillo R, Ayora-Talavera T del R, Abud-Archilla M. 2020. Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. Journal of Food Science and Technology. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04447-w>
- Neri-Numa IA, Arruda HS, Geraldi MV, Maróstica Júnior MR, Pastore GM. 2020. Natural prebiotic carbohydrates, carotenoids and flavonoids as ingredients in food systems. Current Opinion in Food Science 33:98–107. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.004>
- Norbrillinda MT, Mahanom H, Elyana NN, Intan Farina SN. 2016. Optimization of spray drying process of *Sargassum muticum* color extract. Drying Technology 34:1735–1744. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1204550>
- Obluchinskaya ED, Makarova MN, Pozharitskaya ON, Shikov AN. 2015. Effects of ultrasound treatment on the chemical composition and anticoagulant properties of dry *Fucus* extract. Pharmaceutical Chemistry Journal 49:183–186. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1250-8>
- Okolie CL, Mason B, Mohan A, Pitts N, Udenigwe CC. 2019. The comparative influence of novel extraction technologies on *in vitro* prebiotic-inducing chemical properties of fucoidan extracts from *Ascophyllum nodosum*. Food Hydrocolloids 90:462–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.053>
- Onem E, Gulumser G, Akay S, Yesil-Celiktas O. 2014. Optimization of tannin isolation from acorn and application in leather processing. Industrial Crops and Products 53:16–22. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.014>
- Pal Singh I, Bharate SB. 2006. Phloroglucinol compounds of natural origin. Natural Product Reports 23:558. <https://doi.org/10.1039/b600518g>
- Panda D, Manickam S. 2019. Cavitation technology—The future of greener extraction method: A review on the extraction of natural products and process intensification

mechanism and perspectives. Applied Sciences 9:766.  
<https://doi.org/10.3390/app9040766>

- Pavia H, Toth GB, Lindgren A, Aberg P. 2003. Intraspecific variation in the phlorotannin content of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Phycologia 42:378–383.  
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-378.1>
- Pedroche FF, Silva PC, Aguilar Rosas LE, Dreckmann KM, Aguilar Rosas R. 2008. Catálogo de las Algas Marinas Bentónicas del Pacífico de México II. Phaeophycota, First Edit. Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa, Iztapalapa
- Pengzhan Y, Ning L, Xiguang L, Gefei Z, Quanbin Z, Pengcheng L. 2003. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). Pharmacological Research 48:543–549.  
[https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00215-9)
- Pereira L. 2016. Edible Seaweeds of the World, First ed. CRC Press, Coimbra
- Plaza M, Cifuentes A, Ibañez E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science & Technology 19:31–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Herrero M, Señoráns FJ, Ibañez E. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51:450–455. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.016>
- Porgali E, Büyüktuncel E. 2012. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. Food Research International 45:145–154.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.025>
- Prasad KN, Yang E, Yi C, Zhao M, Jiang Y. 2009. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10:155–159.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.007>
- Praveen MA, Parvathy KRK, Balasubramanian P, Jayabalan R. 2019. An overview of extraction and purification techniques of seaweed dietary fibers for immunomodulation on gut microbiota. Trends in Food Science & Technology 92:46–64. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.011>
- Puspita M, Dénier M, Widowati I, Radjasa OK, Douzenel P, Marty C, Vandanon L, Bedoux G, Bourgougnon N. 2017. Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Journal of Applied Phycology 29:2521–2537. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1086-6>

- Quek SY, Chok NK, Swedlund P. 2007. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 46:386–392. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.020>
- Rajauria G. 2015. Seaweeds: A sustainable feed source for livestock and aquaculture. In: Brijesh K. T, Declan J. T (eds) *Seaweed sustainability: Food and non-food applications*, first ed. Academic Press, pp 389–420
- Ramnani P, Chitarrari R, Tuohy K, Grant J, Hotchkiss S, Philp K, Campbell R, Gill C, Rowland I. 2012. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe* 18:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.08.003>
- Rao JS, Kumar B. 2012. 3D Blade root shape optimization. In: 10th International Conference on Vibrations in Rotating Machinery. pp 173–188
- Ravichandran K, Palaniraj R, Saw NMMT, Gabr AMM, Ahmed AR, Knorr D, Smetanska I. 2014. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of food science and technology* 51:2216–21. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0728-6>
- Rebours C, Marinho-Soriano E, Zertuche-González JA, Hayashi L, Vásquez JA, Kradolfer P, Soriano G, Ugarte R, Abreu MH, Bay-Larsen I, Hovelsrud G, Rodven R, Robledo D. 2014. Seaweeds: An opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities. *Journal of Applied Phycology* 26:1939–1951. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0304-8>
- Reports and Data. 2019. Prebiotic Ingredients Market To Reach USD 8.34 Billion By 2026. In: Reports and Data. <https://www.globenewswire.com/news-release/2019/10/16/1930796/0/en/Prebiotic-Ingredients-Market-To-Reach-USD-8-34-Billion-By-2026-Reports-And-Data.html>
- Rezvankeh A, Emam-djomeh Z, Askari G. 2019. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques : A review. *Drying Technology* 38:235–258. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>
- Rioux L-E, Turgeon SL. 2015. Seaweed carbohydrates. In: Brijesh K. T, Declan J. T (eds) *Seaweed sustainability: Food and non-food applications*. Academic Press, pp 141–192
- Rioux L-E, Turgeon SL, Beaulieu M. 2007. Rheological characterisation of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1630–1638. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2829>
- Rodrigues D, Sousa S, Silva A, Amorim M, Pereira L, Rocha-Santos TAP, Gomes AMP, Duarte AC, Freitas AC. 2015. Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the Central

- West Coast of Portugal. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63:3177–3188. <https://doi.org/10.1021/jf504220e>
- Rodrigues D, Walton G, Sousa S, Rocha-Santos TAP, Duarte AC, Freitas AC, Gomes AMP. 2016. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. LWT - Food Science and Technology 73:131–139. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.004>
- Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Gil A. 2019. Effects of sweeteners on the gut microbiota: A review of experimental studies and clinical trials. Advances in Nutrition 10:31–48. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy037>
- Şahin-Nadeem H, Dinçer C, Torun M, Topuz A, Özdemir F. 2013. Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. LWT - Food Science and Technology 52:31–38. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.007>
- Salama AH. 2019. Spray drying as an advantageous strategy for enhancing pharmaceuticals bioavailability. Drug Delivery and Translational Research 10:1–12. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00648-9>
- Samarakoon K, Jeon YJ. 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. Food Research International 48:948–960. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.013>
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. Analytical Methods 5:5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Santos-Zea L, Antunes-Ricardo M, Gutierrez-uribe JA, Garcia-Pérez J V., Benedito J. 2018. Effect of ultrasound transducer design on the acoustically-assisted supercritical fluid extraction of antioxidants from oregano. Ultrasonics - Sonochemistry 47:47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.019>
- Saravana PS, Getachew AT, Cho YJ, Choi JH, Park YB, Woo HC, Chun BS. 2017. Influence of co-solvents on fucoxanthin and phlorotannin recovery from brown seaweed using supercritical CO<sub>2</sub>. Journal of Supercritical Fluids 120:295–303. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.037>
- Sharmila G, Nikitha VS, Ilaiyarasi S, Dhivya K, Rajasekar V, Kumar NM, Muthukumaran K, Muthukumaran C. 2016. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. Industrial Crops and Products 84:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.010>
- Shi Y, Sheng J, Yang F, Hu Q. 2007. Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*. Food Chemistry 103:101–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.028>

- Shin N-R, Whon TW, Bae J-W. 2015. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology* 33:496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
- Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53:10–23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Shrestha S, Zhang W, Smid SD. 2021. Phlorotannins: A review on biosynthesis, chemistry and bioactivity. *Food Bioscience* 39:100832. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100832>
- Silva PC, Pedroche FF, Chacana ME, Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas L, Raum J. 2004. Geographic correlation of morphological and molecular variation in *Silvetia compressa* ( Fucaceae , Fucales , Phaeophyceae ). *Phycologia* 43:204–214
- Strain CR, Collins KC, Naughton V, Mcsorley EM, Stanton C, Smyth TJ, Soler A, Mary V, Paul CR, Cherry P, Allsopp PJ. 2020. Effects of a polysaccharide-rich extract derived from Irish-sourced *Laminaria digitata* on the composition and metabolic activity of the human gut microbiota using an *in vitro* colonic model. *European Journal of Nutrition* 59:309–325. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01909-6>
- Su W, Liu J, Wang H, Li C, Jia N. 2020. Thermodynamic study of three anhydrous polymorphs of D -mannitol in different binary solvent mixtures from T = (258.15 to 278.15) K. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 141:105680. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.01.005>
- Sun X, Xu Y, Zhao L, Yan H, Wang S, Wang D. 2018. The stability and bioaccessibility of fucoxanthin in spray-dried microcapsules based on various biopolymers. *RSC Advances* 8:35139–35149. <https://doi.org/10.1039/c8ra05621h>
- Tandon D, Haque MM, Saravanan R, Shaikh S, Sriram P, Dubey AK, Mande SS. 2018. A snapshot of gut microbiota of an adult urban population from Western region of India. *PloS One* 13:e0195643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195643>
- Tanniou A, Vandanjon L, Incera M, Serrano Leon E, Husa V, Le Grand J, Nicolas J, Poupart N, Kervarec N, Engelen A, Walsh R, Guerard F, Bourgougnon N, Stiger-Pouvreau V. 2014. Assessment of the spatial variability of phenolic contents and associated bioactivities in the invasive alga *Sargassum muticum* sampled along its European range from Norway to Portugal. *Journal of Applied Phycology* 26:1215–123. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0198-x>
- Tapia-Salazar M, Arévalo-Rivera IG, Maldonado-Muñiz M, Garcia-Amezquita LE, Nieto-López MG, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE, Welti-Chanes J. 2019. The dietary fiber profile, total polyphenol content, functionality of *Silvetia compressa* and

- Ecklonia arborea*, and modifications induced by high hydrostatic pressure treatments. Food and Bioprocess Technology 12:512–523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11947-018-2229-8>
- Teh SS, Birch EJ. 2014. Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. Ultrasonics Sonochemistry 21:346–353. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.002>
- Thomas NV, Kim SK. 2011. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. Environmental Toxicology and Pharmacology 32:325–335. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.09.004>
- Tierney MS, Smyth TJ, Hayes M, Soler-Vila A, Croft AK, Brunton N. 2013. Influence of pressurised liquid extraction and solid-liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. International Journal of Food Science and Technology 48:860–869. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12038>
- Tierney MS, Soler-Vila A, Rai DK, Croft AK, Brunton NP, Smyth TJ (2014) UPLC-MS profiling of low molecular weight phlorotannin polymers in *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* and *Fucus spiralis*. Metabolomics 10:524–535. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0584-z>
- Tiwari BK, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Cullen PJ. 2009. Effect of sonication on orange juice quality parameters during storage. International Journal of Food Science and Technology 44:586–595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01858.x>
- Tonon R V., Grosso CRF, Hubinger MD. 2011. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. Food Research International 44:282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>
- Trifan A, Vasincu A, Luca SV, Neophytou C, Wolfram E, Opitz SEW, Sava D, Bucur L, Cioroiu BI, Miron A, Aprotosoia AC, Cioanca O, Hancianu M, Jitareanu A, Constantinou AI. 2019. Unravelling the potential of seaweeds from the Black Sea coast of Romania as bioactive compounds sources. Part I: *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh. Food and Chemical Toxicology 134:110820. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110820>
- Unno T, Osakabe N. 2018. Green tea extract and black tea extract differentially influence cecal levels of short-chain fatty acids in rats. Food Science and Nutrition 6:728–735. <https://doi.org/10.1002/fsn3.607>
- Usov AI, Zelinsky ND. 2013. Chemical structures of algal polysaccharides. In: Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals. Woodhead Publishing Limited, pp 23–86

- Valderrama D, Cai J, Hishamunda N, Ridler N. 2013. Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming: a global synthesis
- van Eunen K, den Besten G, Groen AK, Reijngoud D-J, Venema K, Bakker BM. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* 54:2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.r036012>
- van't Land CM. 2012. Spray Drying. In: van't Land CM (ed) *Drying in the Process Industry*, First Edit. pp 133–162
- Vázquez-Delfín E, Freile-Pelegrín Y, Pliego-Cortés H, Robledo D. 2019. Seaweed resources of Mexico: Current knowledge and future perspectives. *Botanica Marina* 62:275–289. <https://doi.org/10.1515/bot-2018-0070>
- Vázquez-Rodríguez B, Gutiérrez-Uribe JA, Antunes-Ricardo M, Santos-Zea L, Cruz-Suárez LE. 2020. Ultrasound-assisted extraction of phlorotannins and polysaccharides from *Silvetia compressa* (Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology* 32:1441–1453. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02013-2>
- Verspreet J, Damen B, Broekaert WF, Verbeke K, Delcour JA, Courtin CM. 2016. A Critical Look at Prebiotics Within the Dietary Fiber Concept. *Annual Review of Food Science and Technology* 7:167–190. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081315-032749>
- Vieira-Silva S, Falony G, Darzi Y, Lima-Mendez G, Garcia R, Okuda S, Vandeputte D, Valles-Colomer M, Hildebrand F, Chaffron S, Raes J. 2016. Species–function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nature Microbiology* 1:16088. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.88>
- Vissers AM, Caligiani A, Sforza S, Vincken J-P, Gruppen H. 2017. Phlorotannin composition of *Laminaria digitata*. *Phytochemical Analysis* 28:487–495. <https://doi.org/10.1002/pca.2697>
- Vogt SL, Peña-Díaz J, Finlay BB. 2015. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe* 34:106–115. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.002>
- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67:2578–2585. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2578>
- Walton DE. 2000. The morphology of spray-dried particles a qualitative view. *Drying Technology* 18:1943–1986. <https://doi.org/10.1080/07373930008917822>

- Wang P-C, Zhao S, Yang B-Y, Wang Q-H, Kuang H-X. 2016. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review. *Carbohydrate Polymers* 148:86–97. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.060>
- Wang R, Zhao Y, Zhu L, Fang Z, Shi Q. 2020. Effect of carrier types on the physicochemical and antioxidant properties of spray-dried black mulberry juice powders. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00369-0>
- Wang X, Wang X, Jiang H, Cai C, Li G, Hao J, Yu G. 2018. Marine polysaccharides attenuate metabolic syndrome by fermentation products and altering gut microbiota: An overview. *Carbohydrate Polymers* 195:601–612. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.003>
- Wang Y, Han F, Hu B, Li J, Yu W. 2006. *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research* 26:597–603. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.09.015>
- Weitkunat K, Schumann S, Jürgen K, Blaut M, Loh G, Klaus S. 2015. Effects of dietary inulin on bacterial growth , short-chain fatty acid production and hepatic lipid metabolism in gnotobiotic mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26:929–937. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.03.010>
- Weitkunat K, Schumann S, Nickel D, Kappo KA, Kipp AP, Blaut M, Klaus S. 2016. Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. *Molecular Nutrition & Food Research* 60:2611–2621. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600305>
- Weitkunat K, Stuhlmann C, Postel A, Rumberger S, Woting A, Petzke KJ, Gohlke S, Schulz TJ, Klaus S, Schumann S. 2017. Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. *Scientific reports* 7:6109. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06447-x>
- Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchant SS, Helliwell KE, Smith AG, Camire ME, Brawley SH. 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology* 29:949–982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>
- Wijesekara I, Kim SK, Li Y, Li YX. 2011a. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry* 46:2219–2224. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.015>
- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim SK. 2011b. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>



- Wijesinghe WJP, You-Jin J. 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers* 88:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.029>
- Wu Z, Wu J, Lang F, Cai Z, Zeng X, Guo Y, Liu X, Pan D, Pan D. 2020. Characterization of the sortase A from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 involved in adherence to intestinal cells. *Future Microbiology* 15:485–496. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0219>
- Xi J, Shen D, Zhao S, Lu B, Li Y, Zhang R. 2009. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics* 382:139–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.023>
- Xiao J, Li X, Min X, Sakaguchi E. 2013. Mannitol improves absorption and retention of calcium and magnesium in growing rats. *Nutrition* 29:325–331. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.06.010>
- Xu SY, Aweya JJ, Li N, Deng RY, Chen WY, Tang J, Cheong KL. 2019. Microbial catabolism of *Porphyra haitanensis* polysaccharides by human gut microbiota. *Food Chemistry* 289:177–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.050>
- Yeo SK, Liong MT. 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:267–275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3808>
- Yoon M, Kim J-S, Um MY, Yang H, Kim J, Kim YT, Lee C, Kim S-B, Kwon S, Cho S. 2017. Extraction optimization for phlorotannin recovery from the edible brown seaweed *Ecklonia cava*. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 26:801–810. <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1313348>
- Zeković Z, Cvetanović A, Pavlić B, Gajić JŠ-, Radojković M. 2014. Optimization of the polyphenolics extraction from Chamomile Ligulate flowers using response surface methodology. *International Journal of Plant Research* 4:43–50. <https://doi.org/10.5923/j.plant.20140402.01>
- Zhang S, Bi H, Liu C. 2007. Extraction of bio-active components from *Rhodiola sachalinensis* under ultrahigh hydrostatic pressure. *Separation and Purification Technology* 57:277–282. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.04.022>
- Zhang X, Aweya JJ, Huang ZX, Kang ZY, Bai ZH, Li KH, He XT, Liu Y, Chen XQ, Cheong KL. 2020. *In vitro* fermentation of *Gracilaria lemaneiformis* sulfated polysaccharides and its agaro-oligosaccharides by human fecal inocula and its impact on microbiota. *Carbohydrate Polymers* 234:115894. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115894>
- Zheng L-X, Chen X-Q, Cheong K-L. 2020. Current trends in marine algae polysaccharides: The digestive tract, microbial catabolism, and prebiotic potential.

International Journal of Biological Macromolecules 151:344–354.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.168>

Zhu Y, Guo J, Hu X, Liu J, Li S, Wang J. 2020. Eckol protects against acute experimental colitis in mice: Possible involvement of Reg3g. *Journal of Functional Foods* 73:104088. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104088>

Živković J, Šavikin K, Janković T, Čujić N, Menković N. 2018. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 194:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.032>